

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: doktorské studium

Studijní obor: biochemie a patobiochemie



Mgr. Dana Provazníková

Úloha TGF β a studium prognostických faktorů u pacientů s MDS a AML

The role of TGF β and study of prognostic factors of patients with MDS and AML

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Ota Fuchs, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27.6.2011

DANA PROVAZNÍKOVÁ

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Otu Fuchsovi, CSc. za vstřícnost, rady a trpělivost především při sepisování této práce. Dík si také zaslouží celý tým laboratoře – Mgr. Kostečka, Mgr. Holická, Mgr. Vostrý. A děkuji hlavně rodině, bez jejichž podpory by mé studium nebylo možné.

Identifikační záznam:

PROVAZNÍKOVÁ, Dana. *Úloha TGF β a studium prognostických faktorů u pacientů s MDS a AML. [The role of TGF β and study of prognostic factors of patients with MDS and AML]*. Praha, 2011. 150s., 3 přílohy. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfúze. Vedoucí závěrečné práce Fuchs, Ota.

Abstrakt

Neprokázali jsme žádnou mutaci v kódujících oblastech genů signální dráhy TGFβ1, ale zjistili jsme sníženou nebo nedetekovatelnou expresi těchto analyzovaných genů. Snížená exprese je zřejmě způsobena epigenetickými změnami, tedy hypermetylací a deacetylací promotorových oblastí těchto genů. Antiproliferační a apoptotický účinek TGFβ1 byl testován na liniích AML (ML1, ML2, CTV1 a Kasumi1). Rezistence ML2 buněk k inhibici DNA syntézy pomocí TGFβ1 je způsobena jinými faktory než mutacemi genů signální dráhy TGFβ1. Zjistili jsme, že zvýšená exprese genu pro SnoN (Ski-like novel gene) na úrovni mRNA i proteinu je zřejmě důvodem této rezistence. Buňky linie Kasumi1 a ML2 byly citlivé k indukci apoptózy vyvolané působením TGFβ1, ale v menší míře než při působení inhibitoru proteazomu, bortezomibu. Rozdílnost odpovědí AML buněk jednotlivých linií odráží velkou heterogenitu akutní myeloidní leukémie (AML) u pacientů s AML. Analýza prognostických faktorů AML s normálním karyotypem potvrdila, že mutace genu *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) jsou příznivým prognostickým faktorem a naopak zvýšená exprese genů pro EVI1 ("Ecotropic Virus Integration Site 1") a ERG ("ETS-related gene") jsou nepříznivým prognostickým faktorem. EVI1 je také negativním markerem u myelodysplastického syndromu (MDS). Nepotvrdili jsme výnam zvýšené exprese genu MN1 ("Meningioma 1") jako negativního prognostického faktoru.

Klíčová slova: TGFβ, AML, MDS, EVI1, ERG, MN1, CEBPA

Abstract

We did not find mutation in coding areas of genes for components of TGFβ1 signaling pathway but we detected decreased or undetectable expression of these analysed genes. The decreased expression is probably caused by epigenetic changes, so by hypermethylation and deacetylation of promoter regions of these genes. Antiproliferative and apoptotic effect of TGFβ1 was analysed in AML cell lines (ML1, ML2, CTV1 and Kasumi1). ML2 cells resistance to inhibition of DNA synthesis by TGFβ1 is not caused by mutations of genes for components of TGFβ1 signaling pathway. We found that increased *SnoN* (Ski-like novel gene) expression on the level of corresponding mRNA and protein is probably accountable for this resistance. Kasumi1 and M2 cells were sensitive to induction of apoptosis caused by TGFβ1 treatment but in less extent than by proteasome inhibitor bortezomib. The difference of AML cells of different lines answers shows a great heterogeneity AML in AML patients. Prognostic factors analysis in AML with normal karyotype confirmed that *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) mutations predict favourable prognosis but the elevated *EVII* ("Ecotropic Virus Integration Site 1") and *ERG* ("ETS-related gene") expression are connected with unfavourable prognosis. EVI1 is a negative marker for MDS as well. We did not confirm overexpression of *MNI* ("Meningioma 1") as a negative prognostic factor.

Key words: TGFβ, AML, MDS, EVI1, ERG, MN1, CEBPA

OBSAH:

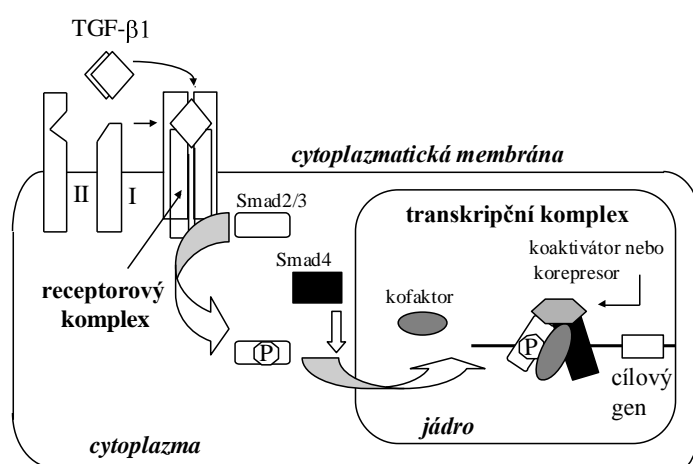
Úvod.....	str. 1
MDS.....	str. 4
AML.....	str. 7
TGFβ1.....	str. 10
EVI1.....	str. 11
ERG.....	str. 12
MN1.....	str. 13
CEBPA.....	str. 13
MYH9.....	str. 15
Hypotézy a cíle práce.....	str. 16
Materiál, metody.....	str. 17
Výsledky.....	str. 27
Diskuse.....	str. 50
Závěr.....	str. 55
Použitá literatura.....	str. 56
Přílohy.....	str. 68
Publikace související s prací.....	str. 68
Autoreferát.....	str. 137
Prohlášení o nahlédnutí do práce.....	str. 150

ÚVOD

Každá fáze buněčného cyklu (G1, S, G2 and M) je kontrolována určitými cyklin-dependentními kinázami (CDK) a jejich regulatorními podjednotkami cykliny. Stavba a úloha CDK se liší podle typu buňky a prostředí. Posun buněčného cyklu z první růstové fáze G1 k syntéze DNA v S fázi je regulován fosforylací proteinu retinoblastomu (pRb). Cyklinový komplex D1/CDK4/6 fosforyluje pRb, zatímco p16^{INK4a} inhibitor CDK, který interaguje s CDK4, inhibuje ten proces. Také další inhibitory CDK p15^{INK4b}, p21^{CIP1/WAF1} a p27^{KIP1} působí na pRb. Tumor supresorová aktivita transformačního růstového faktoru beta (TGFβ) závisí na jeho schopnosti regulovat expresi mnoha proteinů, jenž hrají klíčovou roli v kontrole buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze. TGFβ je schopen způsobit zastavení buněčného růstu u mnoha různých typů buněk včetně epiteliálních, endoteliálních, hematopoetických, nervových a u určitého typu mesenchymálních buněk. TGFβ indukuje transkripci genů pro p15^{INK4b} a p21^{CIP1/WAF1}. p15^{INK4b} specificky bokuje aktivaci CDK4 a CDK6, zatímco p15^{INK4b} a p21^{CIP1/WAF1} inhibují aktivitu CDK2. Indukce p15^{INK4b} a p21^{CIP1/WAF1} je důležitá pro TGFβ zprostředkovaným zastavením buněčného růstu v epiteliálních buňkách, ale ne v hematopoetických buňkách, kde nadbytek p53^{KIP2} je nezbytný pro TGFβ indukovaným zastavením buněčného růstu. Navíc aby mohl TGFβ v epiteliálních buňkách regulovat aktivitu CDK komplexů, TGFβ také inhibuje transkripci protoonkogenů c-myc, které hrají roli v kontrole buněčného cyklu při vstupu do S fáze u vyšších eukaryot. Snížení c-myc vlivem TGFβ je často narušeno v rakovinných buňkách. Identifikace a charakterizace signální dráhy TGFβ pomůže porozumět úloze TGFβ na jedné straně jako tumorsupresorového genu obvykle v počátečním stadiu maligního růstu a na druhé straně naopak jako onkogenního faktoru v pozdních fázích malignit zejména u metastáz. V pozdní fázi vzniku epiteliálního nádoru se buňky často stávají rezistentními na inhibiční účinek TGFβ kvůli inaktivaci signální dráhy TGFβ nebo v důsledku abnormální regulace buněčného cyklu. Pevné nádory často obsahují mutace složek signální dráhy TGFβ, nejčastěji Smad4 a TβRII. Hematologické malignity se potom často stávají rezistentní na TGFβ kvůli snížené expresi členů signální dráhy TGFβ vlivem onkoproteinů jako Evi1, Tax a fúzních proteinů Runx1-Evi1, Runx1-ETO a PML-RARα. Buňky nádoru často vykazují sníženou expresi TGFβ. TGFβ může také ovlivňovat složení extracelulární matrix a degradaci složek, které hrají komplexní roli při vývoji nádoru a vzniku metastáz.

Cytokiny rodiny TGF β regulují tedy růst a diferenciaci různých buněk. Tyto cytokiny mají schopnost kontrolovat funkci buňky, hrají důležitou úlohu v embryonálním vývoji a homeostase tkání. Vedle isoform TGF β patří do této rodiny také aktiviny a kostní morfogenetické proteiny (BMP). Uvedené polypeptidy se váží ke specifickým transmembránovým receptorům (kinasy fosforylující serin a threonin) a zprostředkují přenos signálu uvnitř buňky pomocí Smad proteinů. Po aktivaci se Smad proteiny přemístí do jádra, kde jako komplex se váží na DNA a regulují transkripci cílových genů (obr.1).

Obr.1 Schématické zobrazení signální dráhy TGF β 1 závislé na transkripčních faktorech Smad.



Signální dráha TGF β /aktivinů a BMP je ovlivňována pozitivně či negativně různými mechanismy. Pozitivní regulace zvětší signál na úroveň dostačující pro biologickou aktivitu; negativní proběhne na extracelulární, membránové, cytoplasmatické a jaderné úrovni. Poněvadž TGF β je potenciální růstový inhibitor většiny typu buněk, regulace signalizace TGF β může být spojována s postupem nádoru (zabránění přenosu signálu od TGF β vede k nádorům). Porucha signální dráhy je výsledkem mutace receptorů TGF β (typ I a II) nebo Smad proteinů (Smad2 a Smad4).

Sledovali jsme působení potenciálních chemoterapeutik (inhibitorů MAP-kináz, histodeacetyláz a proteazomů) na složky signální dráhy TGF β . Změřili jsme se především na jeden z inhibitorů proteazomů bortezomib. Bortezomib (PS-341, VELCADE) je účinným inhibitorem proteazomů a klinicky je již používán u pacientů s mnohočetným myelomem rezistentních na zavedené terapie. Jeho vliv jsme zkoumali zároveň s TGF β 1, který indukuje

apoptózu u řady typů buněk. Námi použité linie lidských myeloidních leukemických buněk byly různě citlivé na účinek obou inhibitorů apoptózy jak v čase, tak i co do kvantity účinku. Akutní myeloidní leukémie (AML) a myelodysplastický syndrom (MDS) jsou onemocnění s velkou biologickou a klinickou heterogenitou [1]. Přestavby chromozomů byly nalezeny u přibližně 55% dospělých pacientů s AML a asi u 30-50% pacientů s MDS. Cytogenetika stále představuje nejsilnější prognostický faktor u obou chorob a velmi důležitým faktorem je i stáří pacienta. Mutace genů a změněná exprese genů také dovoluje stanovit prognózu u těchto onemocnění, zvláště u velké skupiny pacientů s normálním karyotypem [2-9].

40% až 45% AML tvoří AML s normálním karyotypem, které nevykazují žádné charakteristické morfologické změny. Prognóza pacientů s AML s normálním karyotypem je střední, v některých případech i lepší a 5-tiletého přežití bylo podle literatury dosaženo asi ve 24 až 42% těchto případů [3,6,9]. Mutace transkripčního faktoru "CCAAT/enhancer-binding protein" (C/EBP) alfa (CEBPA), které mají za výsledek buď dominantně negativní formy tohoto transkripčního faktoru nebo jeho nedostatek pro funkci v diferenciaci na monocyty a granulocyty, jsou spojeny s lepší než průměrnou prognózou. I když kompletní odpověď na chemoterapii se neliší, je zde méně relapsů a dosahuje se lepšího přežití. Sekvenování velkého počtu vzorků, které jsme předpokládali, je velmi zdoluhavé, proto jsme plánovali v rámci této práce testování a zavedení nové metody mutačního skríniku – HRMA (high-resolution melting analysis). Samotné analýze genu CEBPA předcházelo testování metody nageny MYH9.

Vedle mutací genu *CEBPA* (příznivý prognostický faktor), patří mezi prognostické faktory důležité pro léčebnou strategii také hladina mRNA pro transkripční faktor EVI1 ("Ecotropic Virus Integration Site 1"; zvýšená hladina EVI1 mRNA je nepříznivým prognostickým faktorem), stanovení hladiny mRNA pro ERG ("ETS-related gene") a hladiny mRNA pro MN1 ("Meningioma 1"). U 30% až 40% AML s normálním karyotypem byly detekovány mutace *FLT3*. ITD mutace *FLT3* aktivují oblast s tyrosinkinázovou aktivitou receptoru FLT3 přes jeho dimerizaci a autofosforylaci a FLT3 fosforyluje a inaktivuje C/EBPα [10]. *FLT3*-ITD jsou velmi silným prognosticky nepříznivým faktorem.

Zvýšená exprese genu *ERG* patřícího do rodiny genu *ETS* (jedná se o homologní gen k onkogenu v-ets viru E26 způsobujícího ptačí erytroblastózu) je špatnou předpovědí pro léčbu pacienta s AML a s normálním karyotypem [11,12]. Samotný nálezn mutace v genu *NPM1* a nesprávného umístění NPM1 do cytoplazmy nestačí pro prognózu a současný průkaz vnitřních tandemových duplikací (ITD) genu *FLT3* nebo vysoké exprese genu *ERG* znamená horší prognózu a je tedy nutné vyšetření více prognostických znaků pro určení prognózy

pacienta s AML a s normálním karyotypem. Vysoká exprese genu *ERG* znamená horší přežití pacientů s AML a s normálním karyotypem jen při nízké expresi genu *BAALC*, zatímco při vysoké expresi genu *BAALC* není rozdíl v přežití mezi současně vysokou či nízkou expresí genu *ERG* [13]. Vysoká exprese genu *MNI* je také znakem horší prognózy a nevyskytuje se u pacientů s mutacemi genu *NPM1*. Celkové přežití je u pacientů s AML a s vysokou expresí genu *MNI* významně kratší než u pacientů s nízkou expresí genu *MNI* (38,1% oproti 58,8% po 3 letech od diagnózy) [14].

Vysoká exprese genu *EVII*, který je na chromozómu 3q26, je nezávislý špatný prognostický znak pro pacienty s MDS a AML bez přestavby i s přestavbou chromozómu 3q26 [15-18].

MDS

Myelodysplastický syndrom (MDS) je onkohematologické onemocnění řazené mezi klonální onemocnění kostní dřeně. podobně jako jiná nádorová onemocnění vzniká z pluripotentní hemopoetické kmenové buňky, v níž došlo k mutaci v genech regulujících růst, diferenciaci a zánik buňky. zahrnuje tedy změny krvetvorby, jejichž společným jmenovatelem je porucha vyžívání krevních elementů z kmenových buněk kostní dřeně [19]. U nemocných s MDS jsou tyto kmenové buňky poškozeny, akumulují se v kostní dřeni popř. mohou mít zkrácenou životnost. Mohou tak rychleji zahynout v kostní dřeni ještě před uvolněním do oběhu, takže ve dřeni je mnoho nezralých buněk (blastů) a v krevním oběhu je málo normálních, zralých krvinek (nízké počty krevních tělísek nazýváme cytopenie) [20]. Kromě nadměrného množství blastů ve dřeni a nedostatku krvinek v oběhu, dalším typickým znakem MDS je porucha tvaru a funkčnosti krvinek- dysplazie. Zralé krvinky v krevním oběhu nemohou náležitě pracovat vzhledem ke své deformaci. Přítomnost těchto změněných krvinek je zásadní pro diagnózu MDS. Klinický obraz onemocnění je do značné míry variabilní, což je dáno heterogenitou onemocnění. Častým projevem MDS je anémie vyžadující opakované krevní transfuze. Anémie je prakticky vždy přítomna, ale může jít o bicytopenii nebo pancytopenii v periférii, tedy kromě anémie o trombocytopenii a neutropenii. Anémie (chudokrevnost) je způsobena snížením hladiny červeného krevního barviva (hemoglobinu), nebo může být také způsobena neefektivním transportem kyslíku dysplastickými (dospělými ale poškozenými) červenými krvinkami. U většiny pacientů s MDS se objeví neutropenie, tedy nízký počet neutrofilních leukocytů, jež jsou určeny k obraně proti bakteriím. Snížení

počtu a zhoršení funkce bílých krvinek (leukocytů), jejichž hlavní úloha tkví v obraně organismu, se klinicky manifestuje opakovanými bakteriálními či virovými infekcemi, například zápallem plic či močovou infekcí. Většina pacientů s MDS má málo destiček, čili trombocytopenii. Snížení počtu a zhoršení funkce krevních destiček se klinicky manifestuje zhoršenou krevní srážlivostí. Krácivé projevy často postihují kůži ve formě krevních podlitin, ale vyskytuje se i krvácení z pohlavních orgánů, gastrointestinálního traktu nebo velmi závažné krvácení do mozku. Neschopnost kostní dřeně vytvářet zralé a zdravé buňky nastává postupně, a proto MDS nemusí končit smrtí. Někteří pacienti však podlehnou přímým následkům onemocnění: Snížené počty červených krvinek popř. destiček mohou být doprovázeny ztrátou schopnosti bránit se infekcím a zastavovat krvácení [21]. MDS definujeme tedy jako syndrom charakterizovaný proměnnou periferní cytopenií a bohatou dysplastickou hemopoézou ve dřeni, tedy předčasným zánikem těchto buněk ve dřeni, neboli inefektivní hemopoézou [22]. Kromě toho se u zhruba třetiny pacientů během měsíců až let nemoc rozvine do akutní myeloidní leukémie (AML). Proto původní název MDS byl preleukemický syndrom. MDS má obvykle chronický průběh s postupným úbytkem krevních buněk. U pokročilých forem s přítomností blastů v obvodové krvi je průběh často rychlý, ústící v rozvinutou akutní leukémii. Detailní představa o příčinách a mechanismu vývinu onemocnění není v současnosti dosud vysvětlena i přes velké badatelské úsilí posledních 20 let [23,24]. Vzhledem k nejasné patogeneze MDS je terapie nejednotná a je stálým předmětem hledání nových postupů. Postižení MDS v rámci jedné rodiny, včetně sourozenců, je velmi vzácné. Dokladem příbuznosti s leukemiemi je přítomnost chromozomálních aberací podobných jako u akutních leukemií. Na rozdíl od akutních leukemií nebo jiných maligních chorob, u nichž mají buňky dlouhou životnost, neboli mají oddálenou nebo nekonečnou apoptózu, podléhají u MDS buňky naopak předčasné apoptóze [25]. Tato apoptóza byla pozorována u všech FAB kategorií MDS a bylo zjištěno, že je zprostředkována cytokiny, např. cytokiny signální dráhy TGFβ [26]. Cytogenetický nález chromozomálních aberací (až u 60 % nemocných) je velmi cenné pro potvrzení diagnózy MDS a nezbytné pro určení prognózy. Nejčastěji jsou postiženy chromozomy 5,7,Y,8,20,21,11 a další v podobě delecí, trisomie nebo translokací [27,28]. Jedním z chromozomů, který je také sledován u pacientů s MDS, je 3q26. V tomto místě je umístěn gen kódující EVI1 a přestavby chromozomu 3q26 bývají nalezeny právě u pacientů s MDS (a také s AML). Negativním prognostickým znakem u MDS je kromě chromozomálních aberací také zvýšená exprese EVI1 [16].

Pro diagnózu MDS jsou tedy cenné 2 znaky: zvýšený počet monocytů v krvi a přítomnost věnečkových sideroblastů ve dřeni. Oba znaky se mohou vyskytovat ve všech podskupinách MDS [25].

Nejednotnost klinického i laboratorního obrazu a fakt, že průběh tohoto onemocnění se může výrazně lišit u jednotlivých pacientů si vynutila dělení MDS na několik podskupin. V této studii jsme používali dělení MDS podle francouzsko-americko-britského systému (FAB), který byl vyvinut po roce 1980 a který popsal hlavní znaky MDS a utřídil MDS do 5 podskupin a doporučili také jeho název [29]. Poněkud odlišný klasifikační systém používá Světové zdravotnické organizace (WHO), který rozeznává šest typů MDS. A byl navržen o mnoho let později [30]. Centrálním Kritériem FAB systému bylo procento blastických buněk v kostní dřeni, přičemž ve zdravé kostní dřeni jich je méně než 2%. Klasifikace FAB rozlišuje pět typů MDS. V této práci používáme klasifikaci FAB.

FAB–KLASIFIKACE:

- refrakterní anémie (RA)

- refrakterní anémie s věnečkovými sideroblasty (RARS)

- refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB)
(5–19 % blastů ve dřeni)

- refrakterní anémie
v transformaci do AML
(RAEB-T) (20–29 % blastů ve dřeni)

- chronická myelomonocytární leukémie (CMML)

WHO–KLASIFIKACE:

- refrakterní anémie (RA) (dysplazie pouze červené řady)
- 5q minus syndrom
- refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD)

- refrakterní anémie s věnečkovými sideroblasty (RARS) (dysplazie pouze červené řady)
- refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií a věnečkovými sideroblasty (RCMD-RS)

- refrakterní anémie s excesem blastů
- RAEB-1 (low risk, 5–9 % blastů ve dřeni)
- RAEB-2 (high risk, 10–19 % blastů ve dřeni)

- AML (RAEB-T už řazen jako AML)
- neklasifikovaný MDS (MDS-U)

- (v rámci WHO klasifikace je CMML řazena do zvláštní skupiny smíšeného MDS/MPD, tj. smíšených myelodysplastických a myeloproliferativních chorob).

(pozn. refrakterní znamená nereagující na terapii, zde myšlena terapie železem).

Léčba MDS závisí na příznacích pacienta, stádiu onemocnění, rizikové kategorii, věku,

jiných problémech a dostupnosti vhodného dárce kostní dřeně. Ke standardní léčbě nemocných MDS patří zejména podpůrná léčba: prostřednictvím 1. transfuze červených krvinek či destiček (zmírňování příznaků anémie) a terapie cheláty železa k odstranění nadbytku železa, 2. transfuze krevních destiček proti trombocytopenii, a konečně 3. podávání antibiotik k potlačení trvajících nebo recidivních infekcí. Pacient tak po opakovaných transfúzích může mít zvýšené hladiny železa v krvi a jiných tkáních, protože lidské tělo nedokáže vyloučit nadbytečné železo a to se pak akumuluje v některých orgánech (například v játrech a srdci). Proto je pacienti dostávající pravidelné transfúze podáván desferal (deferroxamine), který významně zpožďuje toxické účinky železa a brání selhání orgánů. Terapie novými léky proti chorobě MDS, které jsou zacíleny na jeden nebo více biologických faktorů způsobujících vznik myelodysplasie [21].

Pacienti, kteří mají vyšší pravděpodobnost, že se jejich MDS rozvine do AML mohou být léčeni vysokodávkovanou, neboli „indukční“ chemoterapií, která vyhubí myelodysplastické buňky.

AML

Akutní myeloidní leukémie (AML) je nejrozšířenějším hematologickým maligním onemocněním u dospělých s výskytem asi 3 až 4 případy na 100 000 obyvatel. Jde o klonální onemocnění, geneticky heterogenní, charakterizované nekontrolovatelnou proliferací hematopoetických progenitorových buněk, spojené s akumulací genetických poruch v hematopoetických progenitorových buňkách, které ovlivňují jejich sebeobnovu, proliferaci a diferenciaci a aktivaci antiapoptotických mechanismů. AML je rakovina myeloidní řady krvinek a je pro ni typické zastavení vyžívání na úrovni blastů.

U velké části pacientů lze AML určit cytogenetickou analýzou chromozómní změny důležité pro pathogenezi onemocnění, odpověď na terapii a přežití. Ačkoli AML je charakterizované rozdílnou cytogenetikou, cytogenetické vyšetření stále slouží jako nejdůležitější prognostický faktor u tohoto typu leukémie [31,32], neboť některé podtypy AML jsou spojeny s typickými chromozómními aberacemi (viz. tabulka podtypů AML). AML lze dělit podle mezinárodní francouzsko-americko-britské (FAB) nomenklatury, která vznikla v roce 1976 a jež rozlišuje různé typy AML podle druhu buňky, od kterého se leukémie vyvíjela a míry vyžívání (tedy na základě morfologického a cytochemického vyšetření). Tento typ dělení AML je stále běžně používán, ačkoli v roce 1997 byl předními

světovými odborníky navržen nový systém klasifikace pod záštitou Světové zdravotnické organizace (WHO), který bere v úvahu i etiologické a prognostické faktory.

FAB klasifikace AML:

Dolní hranicí diagnózy AML je přítomnost nejméně 30% myeloblastů ze všech jaderných buněk v kostní dřeni.

- **M0** - akutní myeloblastická leukémie minimálně diferencovaná (podtyp s minimální diferenciací do myeloidní řady, prokázanou imunofenotypizací nebo cytochemicky).
- **M1** - akutní myeloblastická leukémie bez vyzrávání (nemá známky vyzrávání a typická je přítomnost více než 90% myeloblastů ze všech neerytroidních buněk v kostní dřeni a zralejší formy granulopoézy tvoří tedy méně než 10%. Nejméně 3% blastů jsou pozitivní na myeloperoxidázu).
- **M2** - akutní myeloblastická leukémie s vyzráváním (vyznačuje se více než 10% zralejších forem granulopoézy, tedy jde o vyzrávající podskupinu, často se vyskytuje přestavba t(8;21)(q22;q22) spojená s fuzním proteinem AML1-ETO (dnes označovaného RUNX1-RUNX1T1), další často se objevující translokace je t(6;9)).
- **M3** - akutní promyelocytární leukémie APL (v kostní dřeni převažují patologické promyelocyty, spojená s chromozómní přestavbou t(15;17)).
- **M4** - akutní monomyelocytární leukémie AMML (vedle vyzrávání do granulocytární řady je prokazatelné vyzrávání na monocyty, někdy spojená s eozinofilií (M4Eo), inv(16)(p13q22), del(16q)).
- **M5a** - akutní monoblastická leukémie (převažuje monocytární řada, která tvoří více než 80% neerytroidních dřevných buněk, del(11q), t(9;11), t(11;19)).
- **M5b** - akutní monocytární leukémie (převažuje monocytární řada, která tvoří více než 80% neerytroidních dřevných buněk, del(11q), t(9;11), t(11;19)).
- **M6a** – erytroleukémie (je zastoupeno nejméně 50% elementů červené krevní řady ze všech jaderných buněk).
- **M6b** - čistě erytroidní leukémie (velmi vzácná).
- **M7** - akutní leukémie (charakteristická proliferace megakaryoblastů ve výrazně fibrotické kostní dřeni, t(1;22))

WHO klasifikace AML:

Kritériem je přítomnost nejméně 20% blastů v kostní dřeni.

- AML s charakteristickými genetickými abnormalitami, který zahrnuje AML s translokací mezi chromozómem 8 a 21 [t(8;21)], inverzí v chromozómu 16 [inv(16)] a translokací mezi chromozómem 15 a 17 [t(15;17)] typický pro APL].

Pacienti s AML v této kategorii obecně dosahují ve vysoké míře remise a mají lepší prognózu oproti jiným druhům AML.

- AML s multilineární dysplasií. Tato kategorie zahrnuje pacienty, u nichž se AML vyvinula z MDS nebo MPD. Tato kategorie AML se primárně vyskytuje u starších pacientů a je spojena s horší prognózou.
- AML a MDS, sekundární. Tato kategorie zahrnuje pacienty, kteří měli předchozí chemoterapii a/nebo radiaci a následovně se u nich vyvinula AML nebo MDS.
- AML, které nespádají ani do jedné z výše uvedených kategorií. Akutní leukémie smíšeného typu. Tento typ nastane, když leukemické buňky nemohou být klasifikované pouze jako myeloidní nebo lymfoidní buňky nebo kde jsou přítomné oba druhy buněk.

Každý typ AML je spojen s jinou prognózou a odpovědí na terapii. Nejčastější je M2, M4 a M1.

AML stejně jako MDS je onemocnění vzácně se vyskytující u dětí, střední věk pacientů s AML je 70.

Okolo 40% pacientů s AML má normální karyotyp [33]. Prognóza jedinců s karyotypicky normálním AML je střední, procento přežití během 5 let se pohybuje okolo 24-42%.

V uplynulých letech byly zjištěny u AML mutace různých genů jako např. *FLT3* [34,35], *NPM1* [36-38], *CEBPA* [39,40], které jsou spojovány s výsledkem léčby u cytogeneticky normálních AML a slouží jako základní informace pro stanovení rizika a zvolení léčby [9]. Jako další prognostický faktor slouží u pacientů s AML a normálním karyotypem změněná exprese genů důležitých v proliferaci a diferenciaci - *MNI* [14], *BAALC* [41], *ERG* [12]. and *WT1* [42].

U určování typu AML je důležité nejdříve vyloučit nebo stanovit, zda se nejedná o APL (AML M3), protože tento typ leukémie má jedinečnou formu léčby a také má nejvyšší léčitelnost. APL je téměř všeobecně zpracovaný lékem ATRA (all-trans-retinoic acid). Pro APL v relapsu byl schválen arzenik trioxid. Jako ATRA, arzenik trioxide nepracuje s jinými podtypy AML.

U ostatních typů AML je chemoterapeutická léčba rozdělena do dvou fází: dosažení remise a po dosažení remise. Ve všech FAB podtypech (kromě M3) obvyklá počáteční léčba zahrnuje cytarabin (ara-C) a antracyklin (daunorubicin nebo idarubicin). Jakmile je dosaženo

kompletní remise, je nutná terapie, aby se předešlo relapsu nemoci. Postremisní terapie může zahrnovat více intenzivní chemoterapii, známou jako konsolidace chemoterapie nebo transplantace kostní dřeně. Nicméně, i přes agresivní terapii, jen 20% - 30% pacientů dlouhodobě přežívá. Pro pacienty s relapsem AML je transplantace kmenové buňky potenciálně léčivá terapie. V roce 2000, Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) byl schválen ve Spojených státech pro pacienty starší 60 roků s relapsem AML, kteří nejsou vhodní kandidáti pro vysocedávkovanou chemoterapii [43].

TGFβ

Transformační růstový faktor β1 (TGFβ1) je multifunkční cytokin účastnící se mnoha biologických procesů včetně vývoje a růstu buňky, diferenciace, apoptózy, buněčné adheze, migrace, složení extracelulární matrix, angiogeneze a imunitní odpovědi. Signální dráha TGFβ1 jde přes transmembránové receptory serinových/threoninových kinas a aktivaci Smad proteinů (R-Smad). R-Smady tvoří heteromerní komplexy se společným partnerem Smadem4 a přemísťují se do jádra (obr.1). Jaderné komplexy se Smadem regulují expresi mnoha různých genů (např. receptor II TGFβ1 - TβRII, Smad7, aktivátor inhibitoru plasminogenu-1 - PAI-1, JunB, inhibitor cyklin-dependentních kinas - p15Ink4B, p21Waf1/Cip1 a p27Kip1, c-myc, RhoA, Cdk2-aktivovaná fosfatasa - Cdc25A, IL6, inhibitor navázání/diferenciace DNA - Id1, transferrinový receptor 1 - TfR1, alternativní splicing formy SnoN - SnoA, SnoN) interakcí s různými transkripčními faktory a transkripčními koaktivátory a korepresory [44,45]. V buňkách savců existuje osm různých Smad proteinů. Smad 2 a Smad3 jsou aktivovány TGFβ a receptory aktivinu (TβRI (ALK5) a ActRIB (ALK4)), zatímco Smad1, Smad5 a Smad8 jsou aktivovány kostními morfogenetickými proteiny (BMP). V některých případech (endoteliální a hematopoetické buňky) ALK1 (activin receptor-like kinase 1) zprostředkuje signál TGFβ přes Smad1, Smad5 a Smad8 [46,47]. Jsou také známy inhibitory Smadů (Smad6 a Smad7), které snižují signál superrodiny TGFβ [44,45]. V závislosti na buněčné linii TGFβ může také aktivovat jiné signální dráhy, včetně drah mitogenem-aktivované protein kinasy (MAPK), Rho-like GTPasy, fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) a jiné kaskády Smad-dependentní nebo Smad-nezávislou cestou [48].

Inhibice buněčné proliferace je hlavní odpovědí TGFβ epiteliálních, endoteliálních, hematopoetických, neurálních a určitých typů mesenchymálních buněk. TGFβ

zprostředkované zastavení růstu zahrnuje určité mechanismy jako snížení regulace c-myc [49], Cdc25A [50] a zvýšení regulace inhibitorů cyklin-dependentních kinas p15Ink4B, p21Waf1/Cip1 a p27Kip1 [51-53]. Porucha v signální dráze TGF β , ať inaktivací komponent mutací nebo snížením jejich exprese, hraje důležitou roli ve vývoji rakoviny. Mnoho komponent signální dráhy TGF β (T β RII, T β RI, Smad4, Smad2) působí jako tumorové supresory v brzkém stadiu vývoje nádoru [54]. TGF- β může také působit jako onkogen a to v pozdním stádiu vývoje nádoru a metastází [54-57].

Úloha TGF β v leukemogenezi není plně objasněna [58,59]. Samotná porucha v signální dráze TGF β není dostačující pro rozvoj leukémie. T β RI knockautované myši a Smad3-null myši nevykazují žádné známky leukémie [59-61] a mutace ve složkách signální dráhy TGF β se vyskytují vzácně v hematopoetických nádorech [60,61]. Nicméně signální dráha TGF β může být blokována interakcí R-Smadu s mutovanými proteiny. Například fúzní proteiny AML1/ETO, AML1/EVI1 a AML1/MDS1/EVI1 vznikající u myeloidní leukémie translokací chromozómů t(8;21) a t(3;21) se slučují se Smadem3 a potlačují jeho činnost v signální dráze TGF β [62-64]. Onkoproteiny EVI1, E1A, Tax, Ski a SnoN interagují také se Smadem3 a tím potlačují aktivitu jeho transkripčního faktoru a signalizaci TGF β [59]. Ztráta odpovědi na TGF β může být druhý kritický krok ve vývoji leukémie.

EVI1

EVI1 (ecotropic viral integration site 1) je transkripční faktor kódovaný velmi konzervativním genem (je umístěn na ch3 (3q26.2). K expresi EVI1 nedochází v normálních hematopoetických buňkách. Zvýšená exprese EVI1 je způsobena přestavbami chromozómu nebo nenormální aktivací odpovídajícího genu. Overexprese EVI1 byla nalezena u pacientů s MDS a AML v blastické krizi.

Transkripční faktor EVI1 (“ecotropic viral integration site 1“) je kódován genem, který je velmi konzervativní v evoluci (více než 90% homologie v nukleotidové i aminokyselinové sekvenci mezi myši a člověkem) [65]. Gen *EVI1* byl původně objeven jako společná sekvence DNA pro integraci retrovirů u myších myeloidních nádorů [66]. EVI1 nebyl prokázán v normálních hematopoetických buňkách [67]. Exprese genu *EVI1* v hematopoetických buňkách je spojena se vznikem agresivní formy MDS nebo AML, když gen *EVI1* je aktivován po přestavbě chromozómu 3q26.2 [16]. Exprese genu *EVI1* může být také spojena

s deregulací promotoru genu *EVII* bez přestavby chromozomu 3q26.2 [68]. Vysoká hladina *EVII* mRNA (včetně mRNA pro všech pět sestříhových variant a pro fuzní protein MDS1-*EVII*) je velmi nepříznivým prognostickým znakem u pacientů s MDS a AML [69]. Tito pacienti s MDS mají zvýšený počet destiček, významnou hyperplazii s dysplazií megakaryocytů a anemii [16,69,17].

Zatím bylo popsáno několik cílových genů působení *EVII* (*GATA2*, *GATA3*, *Gadd45g*, *SnoN*) [70]. Tyto cílové geny působení *EVII* by mohly hrát úlohu v transformaci buněk účinkem *EVII*. *EVI-1* chrání buňky před stresem-indukovanou apoptózou [71]. Mechanismus spočívá v inhibici c-Jun N-koncové kinázy (JNK), která náleží do větší rodiny mitogeny aktivovaných protein kináz (MAPK). Popsané účinky *EVI-1* (zvýšení exprese endogenního c-Jun a c-Fos a inhibice JNK) závisí na přítomnosti oblastí motivů zinkových prstů v molekule *EVI-1*, které umožňují specifické protein-protein interakce [71,72]. Jednou z nich je interakce mezi *EVI-1* a několika histondeacetylázami, která způsobí kondenzaci chromatinu a tím inhibici transkripce cílových genů působení *EVI-1* [73]. Interakcí *EVI-1* s dalším represorem transkripce, proteinem CtBP ("C-terminal binding protein"), se zvýší účinnost *EVII* jako inhibitoru transkripce cílových genů působení *EVI-1* [74]. *EVII* také interaguje s proteinem BRG1 ("brahma related gene 1"), členem komplexu remodelujícího chromatin SWI/SNF a regulátorem proteinu retinoblastomu (pRB), nádorového supresoru, který reguluje blok buněčného cyklu (přechod buněk z fáze G1 do fáze S). Inhibiční vliv pRB na růst buněk je závislý na regulaci rodiny transkripčních faktorů E2F. Aktivita E2F je nezbytná pro expresi genů zahrnutých v přechodu buněk z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu a pro replikaci DNA. Interakce *EVII* s proteinem BRG1 aktivuje promotor genu *E2F1* a tím způsobí rychlejší průběh buněčného cyklu [75].

ERG

ERG (název odvozen z homologu onkogenu V-ETS viru E26 způsobujícího erytroblastózu u ptáků) mimo jiné řídí transkripci genů zahrnutých v homeostáze. Zvýšená exprese tohoto genu v mononukleárních buňkách pacientů s AML má nepříznivý vliv na průběh tohoto onemocnění - pacienti dosahují v menší míře celkové remise a přežívají kratší dobu.

ERG je gen odvozený z v-ets onkogenu ptačího retroviru E26, způsobujícího ptačí akutní leukemii, erytroblastózu a v menší míře myeloblastózu u kuřat [76]. Transkripční faktor ERG reguluje angiogenezu a apoptózu endoteliálních buněk [83]. Do rodiny transkripčních faktorů ETS patří přibližně 30 členů obsahujících konzervativní DNA-vazebnou oblast (ETS

oblast) [77,78]. Exprese ERG probíhá v endoteliálních buňkách, megakaryocytech a chondrocytech. ERG řídí transkripci genů zahrnutých v homeostáze, diferenciaci a angiogeneze endoteliálních buněk jako jsou *eNOS*, *HO-1* a *ICAM-2* [79,80]. Gen *ERG* byl mapován na chromozomu 21q22. Zvýšená exprese tohoto genu je nepříznivým prognostickým faktorem nejen u AML s komplexními karyotypy, ale také u AML s normální cytogenetikou [11,12]. Zvýšená exprese genu *ERG* má negativní vliv na průběh onemocnění i u dalších malignit (akutní lymfoblastická leukémie T buněk [81], karcinom prostaty [82]).

MN1

MN1 (meningioma 1) je transkripční koaktivátor umístěný na ch22, kódovaný u obratlovců velmi konzervativním genem. Zvýšená exprese MN1 především u AML s normálním karyotypem je spojena s horší prognózou, kratší dobou přežití po relapsu, celkovou kratší dobou přežití.

Meningioma kandidátní nádorový supresorový gen *MN1* na chromozomu 22 kóduje konzervativní jaderný protein o velikosti 150kD, který účinkuje jako transkripční koaktivátor a zdá se, že se neváže přímo na DNA. *MN1* se účastní translokace chromozomů t (12;22)(p13;q12), kdy první exon *MN1* je fúzován k *TEL*, členu rodiny transkripčních faktorů TEL. *MN1* však není spojen s AML jen touto translokací, ale k jeho zvýšené expresi dochází u inv(16)(p13;q22) AML, AML se zvýšenou expresí *EVI1* a u některých AML dospělých s normálním karyotypem. U AML s normálním karyotypem je zvýšená exprese *MN1* nepříznivým prognostickým faktorem s kratším přežitím [14,83-85].

CEBPA

CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein alpha) je transkripční faktor, jenž hraje významnou roli v diferenciaci myeloidních buněk. Mutace tohoto genu jsou spojeny s lepší prognózou - je zde méně relapsů a dosahuje se lepšího přežití.

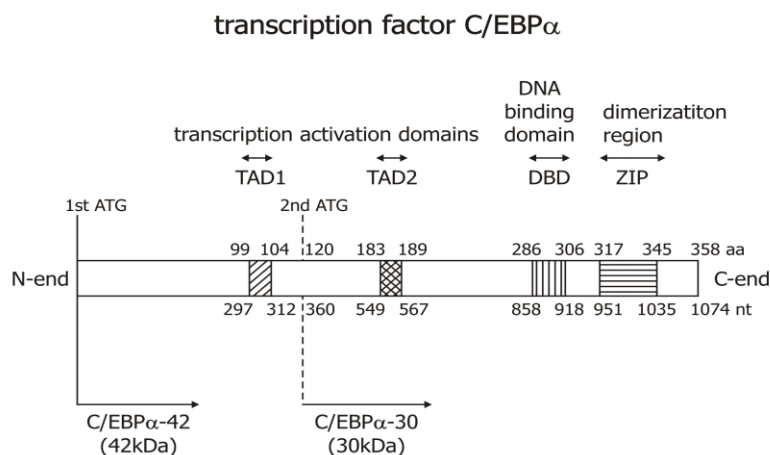
CEBPA je členem rodiny transkripčních faktorů, obsahujících leucinový zip [86]. Tyto transkripční faktory se skládají z N-terminální transaktivační domény, DNA vázající základní domény a C-terminální dimerizační oblasti bohaté na leucin (obr.2). CEBPA je kódován genem bez intronů, který byl mapován na chromozomu 19q13.1, a obsahuje 358 aminokyselinových zbytků (42 kDa). Protein C/EBPα obsahuje tři transaktivační oblasti (TE-I, TE-II a TE-III), oblast pro vazbu CEBPA k DNA označenou BR ("basic region") a oblast

leucinového zipu pro homodimerizaci a heterodimerizaci C/EBP α s dalšími C/EBP a jinými proteiny. Oblast BR rozpoznává přednostně sekvenci DNA 5'-ATTGCGCAAT-3'. CEBPA je inhibítohem proliferace a podporuje diferenciaci hemopoetických buněk na granulocyty. Existuje více mechanismů inhibice proliferace pomocí CEBPA. Zahrnují stabilizaci inhibitoru na cyklinu závislé kinázy cdk2 (p21^{WAF1/CIP1}), regulaci komplexu pRb-E2F, interakci s volným transkripčním faktorem E2F, inhibici exprese genu pro c-myc (cílového genu E2F), inhibici aktivity cdk2 a cdk4 a interakci s komplexy remodelujícími chromatin. CEBPA koordinuje diferenciaci buněk s inhibicí buněčného cyklu a tím proliferace buněk. CEBPA stabilizuje inhibitor na cyklinu závislé kinázy 2 (cdk2), p21/WAF1/CIP1 a interaguje s transkripčním faktorem E2F a inhibuje přechod buněk z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. CEBPA také inhibuje expresi cílového genu transkripčního faktoru E2F, kterým je c-myc a to vede opět k inhibici proliferace buněk.

Mutace transkripčního faktoru CEBPA mají za výsledek buď dominantně negativní formy tohoto transkripčního faktoru nebo jeho nedostatek pro funkci v diferenciaci na monocyty a granulocyty a jsou spojeny s lepší než průměrnou prognózou. I když kompletní odpověď na chemoterapii se neliší, je zde méně relapsů a dosahuje se lepšího přežití.

40% až 45% AML tvoří AML s normálním karyotypem, které nevykazují žádné charakteristické morfologické změny. Prognóza pacientů s AML s normálním karyotypem je střední, v některých případech i lepší a 5-tiletého přežití bylo podle literatury dosaženo asi ve 24 až 42% těchto případů [3,6,9].

Obr.2 Schéma struktury CEBPA.



Čísla nad schématem označují pořadí aminokyselin, čísla pod schématem pořadí nukleotidů (podle GenBank Accession No.NM_004364.2). Převzato z [86].

MYH9

Lidský gen MYH9 („myosin heavy chain 9“) je lokalizován na chromosomu 22q11.2 [87], sestává ze 40 exonů a kóduje těžký řetězec nesvalového myosinu IIA (NMHC-IIA), který je součástí hexamerního enzymatického komplexu účastnícího se vazby aktinu [88]. Mutace v tomto genu způsobují onemocnění souhrně nazývaná „MYH9 onemocnění“, která charakterizují velké destičky, trombocytopenie a kombinace granulocytárních inkluzí, hluchoty, zákalů a selhání ledvin. Termín „MYH9 onemocnění“ označuje skupinu autosomálně dominantních onemocnění, známých jako May-Hegglinova anomálie, Sebastianův, Fechtnerův a Epsteinův syndrom [89]. V současnosti můžeme, z hlediska molekulární patogeneze, označit uvedená onemocnění za různé klinické projevy jednoho onemocnění. Existují tři rozdílné isoformy nesvalového myosinu: MYH9 (NMHC-IIA), MYH10 (NMHC-IIB) a MYH14 (NMHC-IIC). Krevní destičky produkují jen NMHC-IIA protein [90]. Nemoci související s MYH9 jsou diagnostikovány přítomností mutací uvnitř genu MYH9 a granulární lokalizací NMHC-IIA v neutrofilech imunofluorescenčními metodami.

CÍL PRÁCE

Cílem práce je nalézt účinné látky, které ovlivní signální dráhu transformačního růstového faktoru beta (TGFβ) takovým způsobem, aby byla inhibována leukemogeneze. TGFβ je účinným endogenním negativním regulátorem hematopoézy. TGFβ se podílí na tom, že primitivní hematopoetické buňky jsou v klidové fázi a neprocházejí buněčným cyklem. Hematopoetické kmenové buňky mohou při defektech funkce jednotlivých přenašečů signálu TGFβ uniknout regulaci a to může hrát úlohu v leukemogenezi. Signální dráha TGFβ je zprostředkována receptory II. a I. typu, transkripčními faktory (proteiny Smad a MAP-kinázami). Úkolem je zjistit, do jaké míry se Smad proteiny či MAP-kinázy podílejí na přenosu signálu TGFβ u normálních hematopoetických buněk, preleukémie (MDS) a AML. Pro tento výzkum jsme použili specifické inhibitory MAP-kináz (PD98059, UO126, SB203580 aj.). Tato nebo účinkem podobná činidla by mohla v budoucnu najít použití v terapii. Zároveň byl zkoumán vliv inhibitorů histondeacetyláz (HDAI) a proteazomů na

signální dráhu TGF β . Počáteční pokusy byly provedeny na liniích leukemických buněk. Exprese genů pro receptory TGF β , proteiny Smad a cílové proteiny signální dráhy TGF β byly analyzovány semikvantitativní RT-PCR a kvantitativní qPCR, u vybraných genů na úrovni proteinu western blotem.

Hlavní otázky které byly studovány, lze formulovat do následujících bodů: přispět k objasnění role TGF β v buňkách izolovaných z kostní dřeně nebo periferního oběhového systému pacientů s AML (akutní myeloidní leukémie) a MDS (myelodysplastický syndrom), analyzovat TGF β jako potenciální nádorový supresor na základě analýzy výskytu mutací signální dráhy TGF β v leukemických a MDS buňkách, studium nových experimentálních terapií na základě získaných poznatků

Následovaly pokusy na DNA a cDNA získaných od pacientů s MDS a AML. V rámci analýzy prognostických faktorů u AML s normální cytogenetikou (karyotypem) a v případě exprese *EVII* i u MDS bylo cílem projektu zpřesnit prognózu pacientů a dodat část podkladů pro volbu terapie u MDS a AML. Transplantace kmenových buněk kostní dřeně je velmi nákladná a je spojena s komplikacemi jako jsou infekce a reakce štěpu proti hostiteli. Proto u případů AML s příznivou prognózou, kam patří vedle AML s chromozomálními translokacemi t(8;21), inv (16) a t(16;16) i případy AML s normálním karyotypem a mutacemi *NPM1* v nepřítomnosti *FLT3*-ITD, nákladná a riziková transplantace kostní dřeně již nepřináší další zlepšení přežití oproti užívané chemoterapii [9].

Vedle cytogenetiky, která je důležitým prognostickým faktorem, mutace specifických genů a změněná exprese určitých genů také dovoluje stanovit prognózu u akutní myeloidní leukémie (AML) a myelodysplastického syndromu (MDS). Zejména pro AML s normálním karyotypem (40-45% případů AML) bude významná naše analýza důležitých prognostických faktorů: mutace transkripčního faktoru CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alfa (CEBPA), spojené s lepší než průměrnou prognózou a zvýšená exprese genů ERG (“ETS-related gene”), MN1 (“Meningioma 1”) a EVI1 (“Ecotropic Virus Integration Site 1”), které jsou naopak spojené se špatnou předpovědí pro léčbu pacientů s AML a v případě zvýšené hladiny EVI1 mRNA i se špatnou předpovědí pro léčbu u pacientů s MDS. Výchozím materiálem byly mononukleární buňky získané z kostní dřeně nebo periferní krve pacientů s AML a MDS a také zdravých lidí odpovídajícího stáří (kontroly).

Stanovili jsme sekvenací DNA a cDNA mutace transkripčního faktoru CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alfa (CEBPA) spojené s lepší než průměrnou prognózou pro pacienty s AML s normálním karyotypem a pomocí kvantitativní PCR expresi genů ERG,

MN1 a EVI1, jejichž zvýšená exprese je naopak spojena se špatnou předpovědí pro léčbu pacientů s AML s normálním karyotypem a v případě zvýšené hladiny EVI1 mRNA i se špatnou předpovědí pro léčbu u pacientů s MDS. Při sekvenování genu CEBPA jsme chtěli využít mutačního preskríninku přístrojem light scanner založeném na rozdílnosti křivek tání PCR produktů s mutací a bez mutace (kontrola) – metoda high-resolution melting analysis (HRMA).

Naši analýzou mutací *CEBPA* a studiem exprese genů *ERG*, *MN1* a *EVI1* na úrovni hladiny odpovídajících mRNA pomocí kvantitativní PCR chceme přispět k přesnějšímu stanovení prognózy pacientů s AML a MDS a následně i k efektivnější terapii.

MATERIÁL, METODY

Izolace RNA a DNA

Celková RNA byla izolována z mononukleárních buněk buněčné linie nebo vzorku pacienta (periferní krev nebo kostní dřeň) na gradientu Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), poté pomocí RNA-BeeTM-RNA isolation reagent (TEL-TEST Inc., Friendswood, Texas USA) podle návodu výrobce. Koncentrace a čistota RNA byla určena spektrofotometricky poměrem absorbancí A260/A280. Pro získání DNA byly buňky lyzovány 10mM Tris pH9,0, 50mM KCl, 0,1% Nonidet P-40. K 200ul lyzátu byly přidány 4ul proteinasy K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Lyzát byl inkubován při 37°C přes noc a proteinasa K byla inaktivována zahřátím vzorku na 90°C po 10 min..

RT-PCR

Komplementární DNA (cDNA) PCR templát byl získán z celkové RNA buněk buněčné linie nebo vzorku pacienta (periferní krev nebo kostní dřeň) ošetřené DNase I (2μg na reakci) za použití oligo (dT)₁₈ primeru a kitu SuperscriptTMII RnaseH-reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) podle firemního návodu při 42°C.

Reagencie

inhibitory proteinkinázy aktivované mitogeny (MAPK) - typ MEK ½ - UO126, PD98059 -

Calbiochem

- typ p38 – SB203580 - Calbiochem

negativní kontrola pro studium inhibice MAPK – SB202474 - Calbiochem

inhibitory histondeacetyláz (HDAI) – HDAI1 (MS-275), HDAI2 (CBHA), HDAI3 (amidový analog trichostatinu A), apicidin, butyrát sodný -

Calbiochem

inhibitory proteazomů – inhibitory proteazomů 1 a 2 na bázi peptidů, laktacystin, MG132 –

Calbiochem

bortezomib – získán od doc.MUDr.I.Špičky z I.interní kliniky VFN

UK, Praha

Real time PCR

Real time PCR byla použita pro kvantifikaci hladin mRNA vybraných genů. Reakce byla provedena v 0,2 ml tenkostěnných mikrozskumavkách (ABgenes, Surrey, Velká Británie).

Reakční směs obsahovala 12,5 ul SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (kit od firmy Sigma-Aldrich, Praha, ČR), 0,25 ul Internal reference Dye (tentýž kit), 6,25 ul destilované vody a 1 ul cDNA. Amplifikace byla provedena podle návodu výrobce na přístroji

RotorGene 3000 (Corbett Research, Australia): 95°C 120 sec, 30-40 cyklů: 95°C 30 sec, 60°C 60 sec, 72°C 30 sec; 72°C 120 sec, chlazení na 7°C. Expres genů byla vztažena na hodnoty exprese glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) jako kontrolního genu. U vzorků buněčné linie byly hodnoty porovnány s kontrolním vzorkem buněk inkubovaných bez přídavku činidel.

Tab.1 Primery použité pro RT-PCR a real-time PCR

Genbank Accession No.	Gen	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Metoda	Teplota (°C)	Velikost produktu (bp)
BC023632	GAPDH	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC	TGGACTGTGGTCATGAGTCCTTC	RT-PCR + real-time PCR	61	225
BT007386	Smad1	CAGGAGGCAGGTAAGCAGGTGG	GTGGTAGGGATTGATGCAGAC	RT-PCR	60	333
BC014840	Smad2	ATCCTAACAGAACTTCCGCC	CTCAGCAAAACTTCCCCAC	RT-PCR	60	488 *

NM005902	Smad3	AGAAGACGGGGCAGCTGGAXC	GACATCGGXATTCTGGGGATAG	RT-PCR	60	510 *
NM005359	Smad4	GCATCGACAGAGACATACAG	CAACAGTAACAATAGGGCAG	RT-PCR	60	483 *
NM005903	Smad5	CGACAATTGAAACACTAGGCG	TATCTGTTTCAATGTAAGCTC	RT-PCR	60	534
AF015261	Smad7	GCCTCGGACAGCTCAATTCTG	GTCCACGGTGTGTCATAAAC	real-time PCR	60	283
BC042637	ALK1	CAGACCCGGTCTCTCTCA	GCAGAAAGGAATCAGGTGCT	real-time PCR	63	168
NM004612	TβRI (ALK5)	CAATTAAAACTTCCCAGGAT	GCATGAATTATGTTCTCACT	RT-PCR	53	429
NM003242	TβRII	AGCAACTGCAGCATCACCTC	TGATGTCTGAGAAGATGTCC	RT-PCR	58	687 *
X77956	Id1	GCAAGACAGCGAGCGGTG	GCTGATCTCGCGTTGAGG	RT-PCR	58	344
BC009466	JunB	AAGGAGGAACCGCAGACCG	GAAGGCGTGTCCCTTGACC	RT-PCR	58	324
NM000389	p21 ^{Waf1/Cip1}	GGGATGAGTTGGGAGGAGG	GACACACAACTGAGACTAAGGC	real-time PCR	55	327
AF247551	p27 ^{Kip1}	ATGTCAAACGTGCGAGTGTC	CGCTGACATCTGGCTCTC	real-time PCR	65	331
BC018642	cdc25A	CGGTATGTGAGAGAGAGATCG	CAGGGACAGAAAGGCGTAG	RT-PCR	55	449
AY500353	VEGF	ATGAACCTTCTGCTGTCTGGG	GGTGATGTGGACTCCTCAGTG	real-time PCR	55	309
NM001664	RhoA	AGGACCAGTTCAGAGGTG	GCTCTGCTTCATCTTGGC	real-time PCR	55	333
X04744	PAI-1	TGCTGGTGAATGCCCTCTAC	TCATGTTGCCTTCCAGTGG	real-time PCR	55	309
BC015511	IL6	GATGGCTGAAAAGATGGATGC	GAAGAGCCCTCAGGCTGGAC	real-time PCR	58	347
X15217	SnoA	GCATTCTCACAGATCACCTGAC	ACTGCAAGCACTTTATGGC	real-time PCR	53	354
X15219	SnoN	AATGGGATGGGAGATGATGG	TGAGGTGATGGAAGAGGCAG	real-time PCR	65	329
V00568	c-myc	GGAACGAGCTAAACCGGAGC	CTCAAGACTCAGCCAAGGTTG	real-time PCR	55	333
BC001188	TfR1	TGGCTGTATTCTGCTCGTGG	AATGTCCCAACGTCACACG	real-time PCR	56	348

Primery byly navrženy laboratoří Ing.Oty Fuchse za použití programu the Vector NTI Deluxe 4.0 (InforMax, USA, Maryland).

Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

* Primery převzaté z [91].

Tab.2 Primery pro amplifikaci a sekvenování TβRI

Gen	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Teplota (°C)	Velikost produktu (bp)
TβRIex1	GAGGCGAGGTTTGCTGGGGTGAGGCA	CATGTTTGAGAAAGAGCAGGAGCGAG	60	256 *
TβRIex2	AAAAATCTCAAGGTTAACAG	ATGAAGAGTTTTCTGTAG	56	261
TβRIex3	AATAAACATCAACAACGACA	AGCCACAGTCATATATACATC	56	324
TβRIex4	CTCAACACAATCAACAATAT	CTGTAAAGACTTAAAGAGAT	56	253
TβRIex6	AATACCAATCACAACCTACA	TATGAAAGAGAAGGGAAAAA	56	200
TβRIex7	TATTTGGATGAACCTCCTT	CAACTTCTGCTCATGACAAA	56	161
TβRIex8	AGTAGGTATGTGGAACAGAG	AATTGCCTAATATCAAAAAG	56	203
TβRIex9	TCCACCTGCTTTCAGCAC	CCACATGGCTGTTTCTCTGG	60	509

* templáty s oblastí bohatou na CG

Primery byly navrženy laboratoří Ing.Oty Fuchse za použití programu the Vector NTI Deluxe 4.0 (InforMax, USA, Maryland).

Genbank accession number AY497473, Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tab.3 Primery pro amplifikaci a sekvenování TβRII

Gen	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Teplota (°C)	Velikost produktu (bp)
TβRIIex1	TCGGTCTATGACGAGCAG	GGGACCCAGGAAGACC	65	178
TβRIIex2	GACATCAAGTTCATTGAAATTGC	GGAGACAGAGATACACTGACTGTG	65	361
TβRIIex4	CCAACTCCTCTCTCTTGTGTTTG	TCCAAGAGGCATACCTCATAGG	65	444
TβRIIex5	GCTGGAATTAATGATGGGC	GAATAATGCTCGAAGCAACATG	65	263
TβRIIex6	CCACTCCTTCTCTTATCTTAGC	CCTAAGAGGCAACTGGTTGAATC	65	357
TβRIIex7	GCAGGCACTCAGTCAGCAC	CTCTGTTCTTTGGTGAGAGG	65	385

Primery byly navrženy laboratoří Ing.Oty Fuchse za použití programu the Vector NTI Deluxe 4.0 (InforMax, USA, Maryland).

Genbank accession number AY675319, Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tab.4 Primery pro amplifikaci a sekvenování Smad2

Gen	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Teplota (°C)	Velikost produktu (bp)
Smad2ex1	TCCCTCTCTTCCCTACCC	CAGGCTTTACCTGCAAGGTG	52	207

Smad2ex2	GGTAGTCTCTACATCATCCT	GGCAACTTGAAAGGAACACA	57	413
Smad2ex3	AGTAACCAGCACTACATGCCTGTG	CTTTCAAAATATACCCCTCCC	65	309
Smad2ex5	GTAGGTGGACCTAGCTTT	TTAGGAGATTCAGAAAGGCAA	57	283
Smad2ex6	GGTAGCTGAGAGAAAAGGTAGTG	TTGGTATGCGTCTCAACTTC	57	255
Smad2ex7	GCCAAACTGTGACACCTT	GTGCCAGCAGAAAAGACTT	57	478
Smad2ex8	CCAGTGCAGGCTGGCATAGAG	GATGTGGCACACCATGCAATG	65	432
Smad2ex9-10	GCTTCCAAAGTCACACTGA	ATTTGGAGGCTCCCAACTT	57	675
Smad2ex11	GCAGGTACCTAAACATA	AACTTTGGATAGTAAAC	51	301

Primery byly navrženy laboratoří Ing.Oty Fuchse za použití programu the Vector NTI Deluxe 4.0 (InforMax, USA, Maryland).
Genbank accession number AC120349, Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tab.5 Primery pro amplifikaci a sekvenování Smad4

Gen	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Teplota (°C)	Velikost produktu (bp)
Smad4ex1	GCATTGAATCTCTGACTTAACCAG	CAGTATCTGAAGAGATGGAGCAC	60	599
Smad4ex2	CTGAGTTGGTAGGATTGTGAGG	CTACAATACTCGGTTTTAGCAGTC	60	470
Smad4ex3	GTTAGATAGCGTTTATGCTACTTCTG	CAGAGAGGATAGGACAAAACAAAG	60	230
Smad4ex4	GCTGTTACCGCTGAATAAATG	CCCAAGTGACTACACATAAATAAGC	60	482
Smad4ex5-6	CCATGTTAATGTCTTCTTGTTC	CTGAATACTACGCTGAGGGAAC	60	737
Smad4ex7	GCACTTGGCAGATAGCACTG	CTGTGTTTGTGCGTTTCAATC	60	347
Smad4ex8	GGAAAACTGTGTTGTGGAGTG	CACCGACAATTAAGATGGAGTG	60	437
Smad4ex9	GCTATCTTTTGGTTTATGTGATC	CATTCTTCCACCCAGATTTC	60	377
Smad4ex10	AGGCATTGGTTTAAATGTATG	CAACTAATCAAGAAACTCGTC	58	323 *
Smad4ex11	CCAAAAGTGTGCAGCTTGTG	GACCTCAGTCTAAAGGTTGTGGG	60	399

Primery byly navrženy laboratoří Ing.Oty Fuchse za použití programu the Vector NTI Deluxe 4.0 (InforMax, USA, Maryland).
Genbank accession number AC091551, Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

* Primery převzaté z [92]

Buněčné linie

Lidská buněčná linie akutní myelomonocytární leukémie (AMML) ML2 byla získána od Dr. J. Minowady (Fujisaki Cell Center, Okayama, Japonsko). Jedná se o linii časných myeloblastů ustanovenou z kostní dřeně 26-ti letého muže s AML M4 [93].

Lidská buněčná linie ML1 byla rovněž ustavena z lidské myelogenní leukemie v laboratoři Dr. J. Minowady (Fujisaki Cell Center, Okayama, Japonsko), od kterého byla získána přes doc.Dr. Stöckbauera z ÚHKT [94].

Lidská buněčná linie CTV1 byla ustavena z periferní krve pacienta s akutní monoblastickou leukémií v relapsu [95] a byla zakoupena v DSMZ (německá banka mikroorganismů a buněčných kultur). Profil membránových znaků ukazuje, že jde o buňky monocytoidního původu zastavené ve velmi časném stadiu diferenciaci, podobající se prekursorovým buňkám [96].

Lidská buněčná linie Kasumi1 byla ustavena v roce 1991 a obsahuje translokaci t(8;21)(q22;q22), jenž dává vzniknout fuznímu proteinu AML1/ETO (dnes RUNX1/RUNX1T1) a mutaci Asn822Lys v tyrosinkinázové oblasti Kit faktoru. Tato linie slouží jako model pro AML s t(8;21) a tím pro studium vlivu fuzního onkogenu RUNX1/RUNX1T1 na diferenciaci myeloidních buněk [97,98]. Linii jsme získali z pracoviště laboratorního centra kliniky dětské hematologie a onkologie UK 2.LF, vedené prof. MUDr. Janem Trkou, PhD v Motole.

Buňky byly pěstovány při koncentraci $0,4-1,0 \times 10^6$ buněk/ml v RPMI 1640 médiu s 10% fetálního hovězího séra (FTS) ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂ při teplotě 37°C. Životnost buněk byla sledována pomocí barvení eosinem. Nízká koncentrace aktivního TGFβ1 (15 pg/ml) je přítomna ve 100% FTS [99]. Buňky byly pěstovány v médiu s 10% FTS, které obsahovalo jenom 1,5 pg aktivního TGFβ1. Tedy na buňky působil pouze přidaný TGFβ1.

Proliferace sledovaná inkorporací [6-³H] thymidinu do buněk ML2

Inkorporace [6-³H]thymidinu byla použita ke sledování syntézy DNA a tím proliferace. Buňky ML2 byly inkubovány bez nebo s TGFβ1 24h nebo 72h. Hned poté byl přidán [6-³H]thymidin (185kBq/ml; Nuclear Research Institute, Řež, ČR) a buňky byly dále inkubovány ještě 4h (obr.3,4). V jiném případě byl [6-³H]thymidin přidán hned na začátku inkubace (obr.5). Buňky byly dále centrifugovány a třikrát promyty studeným PBS, potom byly lyzovány vodou a značená DNA byla sražená trichloroctovou kyselinou (TCA, výsledná koncentrace 10%). Sraženina byla zachycena na nitrocelulózový filtr, promyta studenou 10% TCA a radioaktivita byla měřena za použití přístroje Beckman LS 1801 liquid scintillation counter.

Identifikace apoptotických buněk

Buňky ML2 (5×10^5 /ml) byly inkubovány 0 - 96 hodin bez přidání (kontrola) nebo s přídavkem DMSO (0,5ul/ml; kontrola pro skupinu SB431542), TGFβ1 (5ng/ml a 10ng/ml), bortezomibu (4nM a 10nM), SB431542 (5uM) a s kombinací těchto sloučenin (obr.6). Další

pokus zahrnoval inkubaci 24-96h linie ML1, ML2, CTV1 a Kasumi1 bez (kontrola) nebo s přidavkem TGF β 1 (5 ng/ml nebo 10 ng/ml), s borteomibem (4 nM nebo 10 nM) (obr.6) nebo inhibítozem receptozu typu I pro TGF β 1 SB431542 (5 μ M) a jejich kombinací (obr.7,8). Barvení Annexinem V/propidium jodidem (Immunotech, Marseille, France) bylo použito pro stanovení apoptózy. Barvení bylo stanoveno na průtokovém cytometru Coulter Epics XL (Coulter Corporation, FL).

Analýza buněčného cyklu

Linie ML2 a Kasumi1 byly inkubovány po 24h bez (kontrola) nebo s přidavkem TGF β 1 (5 ng/ml nebo 10 ng/ml) nebo s borteomibem (4 nM nebo 10 nM) (obr.9,10). Aktivita enzymu kaspázy-3 byla měřena enzymatickým štěpením fluorogenního peptidového substrátu Ac-DEVD-7-amino-4-methyl-kumarinu. Statistická významnost výsledků byla ověřena Studentovým párovým t-testem.

PCR reakce

PCR reakce pro jeden vzorek obsahovala: 100 μ mol dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 μ M primer forward a revers, 1 U Taq polymerázy, 2,5 μ l PCR pufru (Fermentas AB, Vilnius, Litva) a 2 μ l cDNA. Počet cyklů při amplifikaci se lišil podle použitých dvojic primerů (25-35 cyklů). PCR produkty byly děleny na 1,2% agrozovém gelu, barveny ethidium bromidem a relativní intenzita produktů byla měřena na fosforimageru FLA-2000 (FujiFilm, Tokyo, Japonsko) za použití BASReader softwaru (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Německo). PCR produkty z tohoto snímku byly kvantifikovány za použití softwaru Aida (Raytest). Množství mRNA příslušných genů bylo vztaženo na expresi genu GAPDH (glyceraldehyd 3-fosfátdehydrogenáza).

Sekvenování složek signální dráhy TGF β

PCR amplifikace exonů pro geny Smad4, Smad2, T β RI (ALK5) a T β RII byla provedena za použití určitých dvojic primerů pro každý exon a DNA z buněk ML2. Kit BD AdvantageTM GC Genomic Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, Kalifornie USA) byl použit k amplifikaci

GC-bohatých oblastí DNA. PCR produkty byly izolovány elektroforeticky na 2% agaróze, poté elektroeluovány z gelu a přesráženy. K sekvenační reakci byl použit kit Big dye Terminator v3.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornie USA) podle návodu výrobce. PCR produkt byl sekvenován na analyzátoru ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Western Blot

Buňky ML2 (10^7 buněk, buňky ošetřené rekombinantním lidským TGF β 1 (CytoLab Ltd./PEPROTECH, Rehovot, Israel), nebo jinými látkami, buňky bez reagensů-kontrola) byly stočeny při 2000 rpm 10min (Hettich Universal 16R), promyty studeným PBS a lyzovány v 500 μ l pufru o složení: 10mM Hepes pH7,4, 0,14 M NaCl, 1,5% Triton X100 a koktejl inhibitorů proteáz (Complete Mini, Roche, 1 tableta/10 ml pufru). Po přidání pufru byly buňky nechány 10 min na ledu. Lyzáty buněk byly stočeny 50 min při 14 000 rpm (Hettich Universal 16R), supernatanty oddeleny a analyzovány na obsah proteinů za použití biorad Protein Assay a Biorad SmartSpec Plus spektrofotometru. Vzorky obsahující 30 μ g proteinu byly smíchány se stejným množstvím 2 x SDS loading pufru (100 mM Tris.Cl pH6,8, 200 mM dithiotreitol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 20% glycerol, 5% 2-merkaptoetanol) a zahřáty na 95°C 5 min. Po krátkém stočení byly vzorky oddeleny pomocí SDS elektroforézy za použití prefabrikovaného 4-20% polyakrylamidového gradientového minigelu (Invitrogen, Kalifornie, USA), při konstantním napětí 110V 1,5 hodiny (pufr: 25 mM Tris, 250 mM glycín, 0,1% SDS, pH8,3). Takto oddělené proteiny byly nanášeny na Hybond-P PVDF membránu (Amersham Pharmacia Biotech, Vídeň, Rakousko) za použití Hoefer Western Blotting SEMIPHOR systému (transfer pufr: 25 mM Tris, 250mM glycín, 15% methanol, pH8,3). Blotování probíhalo 1h při konstantním proudu 44 mA. Membrány byly nechány přes noc v 0,2% Tween-PBS blokovacím pufru při teplotě 4°C. Bloty byly poté inkubovány se specifickou primární protilátkou (myší monoklonální protilátka proti lidskému TGF β 1 - CytoLab Ltd./PEPROTECH, Rehovot, Israel a Sigma-Aldrich, Praha, ČR, polyklonální králíčí protilátka proti lidskému Sno - Upstate Ltd., Dundee, Velká Británie, monoklonální protilátka proti lidskému p21Waf1/Cip1 (F5) - Sant Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornie USA), následně se sekundární protilátkou značenou peroxidázou z křenu (sekundární hovězí protilátka proti myší protilátce s konjugovanou peroxidázou (HRP) - Sant Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornie USA, sekundární kozí protilátka proti králíčí

s konjugovanou peroxidázou (HRP) - Upstate Ltd., Dundee, Velká Británie). Specifické pásy proteinu byly vizualizovány chemiluminiscencí podle návodu výrobce (ECL Plus western blotting Detection System, Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire) na autoradiografický film (hyperfilm™ ECL, Amersham) (obr.11).

Charakteristika pacientů

Ve studii jsme se zaměřili na pacienty s diagnózou myelodysplastického syndromu (MDS) nebo akutní myeloidní leukémií (AML) s převážně normálním karyotypem. Vzorky pacientů byly porovnány se vzorky zdravých lidí odpovídajícího stáří (kontroly).

Pacienti poskytli informovaný souhlas se zpracováním vzorku biologického materiálu na molekulárně genetická vyšetření.

PCR pro CEBPA

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena za použití genomové DNA nebo cDNA a Advantage-GC Genomic Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA). Tato speciální Taq polymeráza byla použita, protože sekvence genu *CEBPA* jsou bohaté na G a C nukleotidy. Dva a v některých případech čtyři překrývající se páry primerů, které pokrývají celou kódující oblast lidského genu *CEBPA*, byly použity v PCR [100]. Při neobvyklých výsledcích sekvenace jsme použili pro potvrzení mutace další dva primery (BF, BR) v reakci PCR [101]. Umístění primerů na C/EBPα cDNA sekvenci (GenBank Accession No. U34070): FPP1 (562-585) 5'-TCGCCATGC- CGGGAGAACTCTAAC-3', RPP1 (1114-1137) 5'-CTGGTAAGGGAAGAGGCCGGC- CAG-3', FPP2 (1060-1079) 5'-CCGCTGGTGATCAAGCAGGA-3', RPP2 (1739-1762) 5'-CACGGCTCGGGCAAGCCTCGAGAT-3', F1 (563-582) 5'-CGCCATGCCGGGAGAAC-TCT-3', R1 (850-869) 5'-GCCTTGCCCTTCTCCTGCTG-3', F2 (829-848) 5'-GACC-TGTTCCAGCACAGCCG-3', R2 (1122-1141) 5'-GCGGCT GGTAAGGGAAGAGG-3', F3 (1084-1103) 5'-CGCGAGGAGGATGAAGCCAA-3', R3 (1426-1450) 5'-CCCGGTACTC-GTTGCTGTTCTTGTC-3', F4 (1404-1423) 5'-GGGCAAGGCCAAGAAGTCGG-3', R4 (1651-1670) 5'-CCTCACGCGCAGTTGCCCAT-3', BF (816-835) 5'-CGAGTTCCTG-GCCGACCTGT-3', BR (1119-1138) 5'-GCTGGTAAGGGAAGAGGCCG-3'. PCR proběhla v 25 µl reakční směsi obsahující 40 mmol/L Tris-HCl (pH 9,3 při 25°C), 85 mmol/L KOAc, 5% DMSO, 0,1% DMSO, 1.1 mmol/L Mg(OAc)₂, 1 mmol/L GC-Melt (Clontech Laboratories, Inc.), 0,2 mmol/L každého dATP, dTP, dGTP a dTTP, 0,2 µmol/L

obou, forward a reverse primerů, 1,7 jednotek *Tth* DNA polymerázy z Advantage GC Genomic Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.) a okolo 50 ng genomové DNA. Amplifikace byla provedena s počátečním stupněm tepelné denaturace 4 min při 94°C, následovalo 39 cyklů po 30 s denaturace při 94°C, 1 min pro nasednutí primerů při 65°C (FPP1-RPP1 a F1-R1, 64°C pro FPP2-RPP2, 63°C pro F2-R2, 60°C pro F3-R3, F4-R4 a BF-BR) a 100 s prodloužení při 72°C v cyklu Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA).

PCR pro MYH9

PCR byla provedena v celkovém objemu 25 µl obsahujících cca 14 ng genomové DNA, 0.5 µM primery, 0.2mM dNTP, pufr, 0.8 M nebo 0.4 M DMSO a 1U Platinum Taq polymerasy (vše Invitrogen, USA) na přístroji PTC-200 thermocycler (MJ Research, Massachusetts, USA) při 95°C 4 min, následující 40 cykly: 95°C 30 s, specifická teplota pro každý pár primerů (tab.6) 30 s, 72°C 15 s, konečný krok při 72°C po dobu 2 min.

Tab.6 Primery pro amplifikaci a sekvenování MYH9

Gen	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Teplota (°C)	Velikost produktu (bp)
MYH9ex1	CCACCTCGGAGCCCTCAGAC	TGATCTTGTGTGGCTGACGTAGTT	62	462
MYH9ex2	AATGAGGCCCCAGGTGAAGATTCA	TCCTTTGAAGCCGAGATATTTTGC	62	304
MYH9ex3	AGCTCTTTGGGAGCAAGGTG	CAAGAATGAGAACAGACTGGGG	62	157
MYH9ex4	GGGAAGGGACAGAGGTCAAG	ATCATCCCACCAAGGCCAAG	66	215
MYH9ex5	GACATGCTGACACGGCTCTG	AAAGGCAGCATGAGCCAAAG	62	267
MYH9ex6	TCTCTAGTCCCATGTCAGG	TACAGAGGTCATGCCTCCCC	66	182
MYH9ex7	TGAGGAAAGTGGAGGGCTTG	GGTCCAATTCTGGCAAGAGG	66	226
MYH9ex8	GCCTCCACTTTCAGCACCTC	TGGGTACCAGCCTTCTCTG	62	251
MYH9ex9	TTCCTCCTGAGCAAAATCCATG	GGAATCACCATGACCCATGTCTG	62	217
MYH9ex10	GCAGAGGGACTTATTCTCTTGGG	AACAGCCTCAACTGTGCTGC	66	288
MYH9ex11	CTGGGGCATAGGGTATGAGG	GGATAAGGCAACCAACAGGC	66	284
MYH9ex12	GAAGGGAAAAGCCAGAGGCAGG	CCTCTTAGTGCAGGGTTGGCG	62	276
MYH9ex13	GGCTTTGGCTTCTTGAAGGG	TCGACTCCACCTCTCTGTG	66	305
MYH9ex14	TGAGCACACATGTCCCCAG	GAGGTGGGAAGATGACCAGC	62	232
MYH9ex15	CTTTTCCTGTCCGACGTGTG	TGCTTTTGCTGGGGAGACAG	62	377
MYH9ex16	TCTGCTCCTTGACTATTCTCCG	GACTCACTGCACGCACAGC	62	249
MYH9ex17	CATGTGGAATCGAGGCAATG	GGCACTCCCCAGACAAGG	62	183
MYH9ex18	CCTTTCATGGAGCTGTGGC	GCTAAGTGGCCTTTGGCAAC	66	294
MYH9ex19	GCCAGGTATGTATGGTGGTGTGCA	CAGGACTGTTAGGTGGGTCTGCT	62	236
MYH9ex20	GTGGCAGCACCAGGCAGGTC	AGAGGCGGCATCTTCCAGC	63	238
MYH9ex21*	CAGCCTCCTTGGACCCTAATTCC	TGGCGTCCGCTCTTGAGGA	62	388
MYH9ex22	GGACCTTGCTGCCTTCACC	ACCACACTCTCCATCCACG	62	270
MYH9ex23	TCCATTGAGCCCCAGATTTC	GAGAAGGCCTCGGTGTTCC	62	321
MYH9ex24	GGAGACAGAACCATGGCAC	GAAGTAGGGCCAGCAGCAAG	66	298
MYH9ex25	TGCTGCTCCTTGGAGGTGAAAC	GGGTCCATGTCTCCAAGCC	62	341
MYH9ex26	CTCGCTCCAGCATCCCC	TGCTCTGCAGGACTGGTTTG	62	277
MYH9ex27	TGATGATAGACCAGCCAGCC	CCACAACTGCTGCTAGGGC	66	329
MYH9ex28	CCTAAAGGAGATGAGGTGGGG	CACAGAGGCCTTTCTGGAGG	66	233
MYH9ex29	TGCAGTGCCCAAGGCCAGTGC	CCTCTCCCAAGGGTGTGGGG	66	307
MYH9ex30	ACCTGAGCAGGTGCCATC	GCCCTTTGCTTTGGACTCAG	62	367
MYH9ex31	ACACCGACCCTCTGTGATGACCC	CTGCTGGGGGGCGTAGCTCT	62	329
MYH9ex32	CACAGACTCCGGGTGCG	AGCCTGCGTGAAGCCAAG	66	347
MYH9ex33	ATATGTAGTTGGCTCAGTCGGGTGC	GGTCTCCCAAGGGTCCAGCT	56	270
MYH9ex34*	AGCTGAAAGCCCCACGCTGC	CCCTGTTGGCGAGGTGACCC	62	283
MYH9ex35-6	GGGTCCAAGGCCAGCTCTGC	TGCTCTTGTGGGGCTGTGGC	66	418

MYH9ex37*	GGCTCAGGAGACAGAGAGCTGG	CTGCTGCCACCTTCCTCTGG	62	399
MYH9ex38	TCCTGGTTAGGGCTTGTGG	CTGTCACCCCATCTGCTG C	66	243
MYH9ex39*	TGGTGACATTCGTGCCTTGCTTG	CGCCCAGAGCCCCTAACCG	62	320
MYH9ex40	GGAAGGGGAGGCTGTGGTGTCT	ATGTGTGGGCTGTGCTGTGG	63	149

Primery byly navrženy firmou KRD (Česká republika) a Mgr. Provoznicovou za použití programu the Vector NTI Deluxe 4.0 (InforMax, USA, Maryland). Genbank accession number NC00022 a HS6802, Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

* V PCR použit 0,4 M DMSO, jinak vždy přidán 0,8 M DMSO

HRMA

Analýza křivek tání (high-resolution melting analysis, HRMA) je založena na interkalaci specifického barviva LC Green plus do dvoušroubovice DNA a sledování změn tvaru křivek tání PCR produktů pacientů v porovnání s kontrolami (zdraví dárce). Schopnost metody spolehlivě zachytit každý mutovaný vzorek byla nejdříve ověřena na analýze exonů genu MYH9. Byla připravena PCR s DNA pacientů nebo zdravých dárců dle uvedeného postupu, z níž 20 µl bylo přeneseno do 96-jamkové destičky a smícháno s 2 µl LC Green plus (Idaho Technology, USA). Vzorky byly převrstveny kapkou minerálního oleje a vloženy do přístroje light scanner (Idaho Technology, USA). Rozpětí teplot bylo nejdříve 55°C – 98°C, poté bylo nastaveno užší rozpětí (80°C – 98°C). Data byla analyzována v programu Light Scanner Software with Call-IT (obr.21,22) a výsledky byly zobrazeny jako graf závislosti fluorescence na teplotě. PCR produkty označené jako mutované byly sekvenovány.

Sekvenační reakce pro MYH9

PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu Invisorb Spin PCRapid kit (Invitek, Berlin, Německo) a sekvenovány za použití kitu DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, California, USA) v obou směrech na přístroji CEQ 8000 Genetic Analysis System. Použité primery byly stejné jako při PCR. Databáze GenBank Accession No. HS_6802 byla použita pro vyhodnocení získaných výsledků sekvenace.

Sekvenační reakce pro CEBPA

PCR produkty byly rozděleny a přečištěny elektroforézou v agarosovém gelu, elektroelucí získány z vyříznutých proužků gelu a sekvenovány za použití kitu BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) v obou směrech na přístroji ABI 3100 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Použité primery byly stejné jako při PCR. Databáze GenBank Accession No. NM_004364.2 byla použita pro vyhodnocení získaných výsledků sekvenace. Některé publikované práce používají jinou srovnávací

sekvenci C/EBP α cDNA a to GenBank Accession No. U34070, a proto jsou výsledky popsány i podle této srovnávací sekvence.

Real time PCR pro EVI1, ERG, MN1

Kvantitativní řetězová polymerázová reakce (PCR) je provedena na 36-jamkovém rotoru (přístroj Rotor Gene 6000 nebo 3000A, kanál: Green, 470 nm 510 nm, autooptimalizace (2F1-5F1, vždy na stejný vzorek na pozici 1). Celkový objem 1 reakce činí 25 μ l a obsahuje 6,25 μ l H₂O, 12,5 μ l SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix obsahující Taq polymerázu (Sigma), 2,5 μ l 2 μ M forward primer, 2,5 μ l 2 μ M reverse primer, 0,25 μ l referenční barvička a 1 μ l cDNA. Primery pro EVI1: forward primer 5'-

AGCAACGTCGAATCAAGACCTGCTTCAGAT-3', reverse primer 5'-

ACTGACTGTAAGAGCTCACTGGCCTCAGGT-3' [15], pro ERG: forward primer 5'-

CACGAACGAGCGCAGAGTTA-3' [102], reverse primer 5'-

AGAAGGATGTCTGGCGTTGTAGC -3', referenční databáze NM_004449.3, pro MN1:

forward primer 5'-GACGACGACAAGACGTTGG-3', reverse primer 5'-

GACAGACAGGCACTGCAAG-3', referenční databáze NM_002430.2

Profil kvantitativní PCR: Hold - 95°C 2min, Cycling – 40-45 cyklů, 95°C 15 sec, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 80°C 15 sec, Melt analýza – 72°C – 95°C (kontrola čistoty cDNA).

Hladina mRNA pro EVI1, ERG i MN1 je vztažena ke hladině mRNA pro GAPDH (glyceraldehyd-3-dehydrogenázu, “housekeeping mRNA“). Za zvýšenou expresi byly označeny hodnoty více než pětkrát větší než jejich střední hodnota u zdravých kontrol (podobné věkové skupiny jako pacienti).

VÝSLEDKY

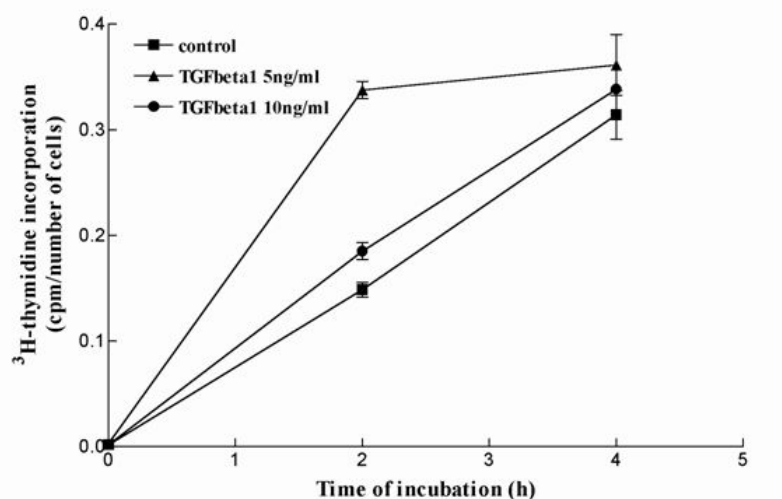
Účinek TGF β 1 na proliferaci buněk ML2 a sekvenování složek dráhy TGF β 1

Ztráta schopnosti reagovat na inhibiční účinek TGF β 1 na růst je běžný rys mnoha druhů rakoviny, u nichž byla zjištěna mutace některých složek signální dráhy TGF β (T β RII, T β RI, Smad4, Smad2) [54]. Proliferace většiny AML buněčných linií nebo primárních AML buněk je citlivá k inhibici TGF β 1 [103-108]. Nicméně nezjistili jsme inhibiční účinek TGF β 1 na proliferaci ML2 buněk za použití inkorporace [6-³H] thymidinu do buněk (obr.3-5).

Rezistence proliferace AML buněk k TGF β 1 není specifická pouze pro ML2 buňky a některé

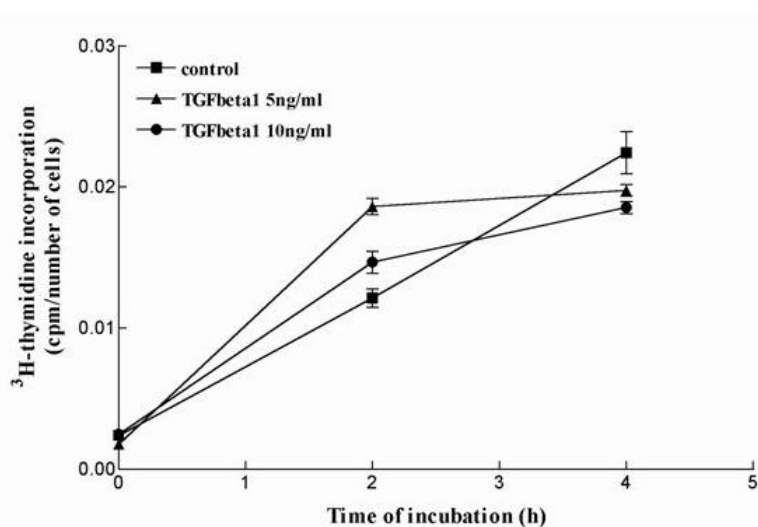
buněčné linie [103-107], ale některé primární AML buňky jsou také resistantní na TGF β 1, když jsou pěstovány s růstovými faktory [103,107,108].

Obr.3 Inkorporace [6- 3 H]thymidinu do ML2 buněk.



ML2 buňky byly preinkubovány v médiu RPMI 1640 s 10% fetálním hovězím sérem při 37°C, 5%CO $_2$ bez TGF β 1 (kontrola) nebo s TGF β 1 (5ng/ml nebo 10ng/ml) po 24 hodin. [6- 3 H]thymidin (185kBq/ml) byl poté přidán a jeho inkorporace do buněk byla měřena po 0h, 2h a 4h další inkubace (v triplicátech). Po této inkubaci byly buňky centrifugovány a promyty třikrát ledovým PBS. Buňky byly poté lyzovány destilovanou vodou a označená DNA byla vysrážena trichloracetátovou kyselinou (TCA, konečná koncentrace 10%). Precipitát byl zachycen na nitrocelulózovou membránu filtru, promyt studenou 10% TCA a radioaktivita byla měřena na přístroji Beckman LS 1801 liquid scintillation counter.

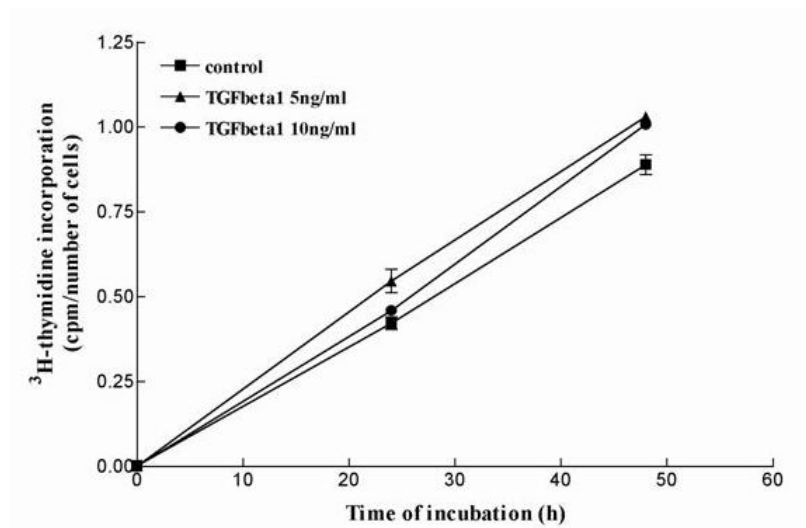
Obr.4 Inkorporace [6- 3 H]thymidinu do buněk ML2.



Buňky ML2 byly preinkubovány v médiu RPMI 1640 s 10% fetálním hovězím sérem při 37°C, 5%CO $_2$ bez

TGFβ1 (kontrola) nebo s TGFβ1 (5ng/ml nebo 10ng/ml) po 72 hodin. [6-³H]thymidin byl poté přidán a jeho inkorporace do buněk byla měřena po 0h, 2h a 4h další inkubace viz. popis u obr.3.

Obr.5 Inkorporace [6-³H]thymidinu v buňkách ML2.



Buňky ML2 byly preinkubovány v médiu RPMI 1640 s 10% fetálním hovězím sérem při 37°C, 5%CO₂ v přítomnosti [6-³H]thymidin (185kBq/ml) a bez TGFβ1 (kontrola) nebo s TGF-β1 (5ng/ml nebo 10ng/ml). Inkorporace [6-³H]thymidinu do buněk byla měřena po 0h, 24h a 48h další inkubace viz. popis u obr.3.

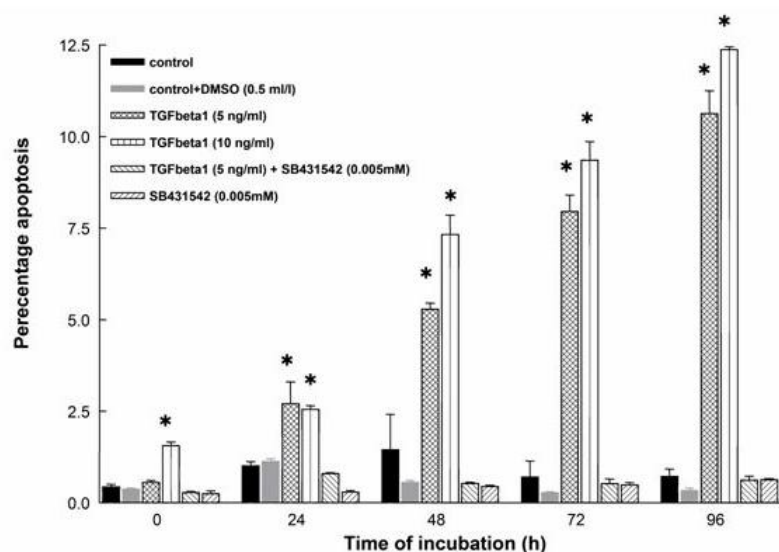
Jedním z důvodů, proč buňky ML2 vykazují resistenci k inhibičnímu účinku TGFβ1 na růst, by mohla být mutační aktivita signalizačních komponent (TGFβ1 receptorů a Smad proteinů - Smad4 a Smad2). Sekvenovali jsme exony těchto genů v ML2 buňkách, ale žádnou mutaci jsme nezachytili. Naše výsledky naznačují, že rezistence ML2 buněk k TGFβ1 je způsobena jinými faktory než mutací/emi genů signalizační dráhy TGFβ1.

Indukce apoptózy v buňkách lidských leukemických linií

Barvení annexinem V bylo použito k analýze TGFβ1 jako induktoru apoptózy v buňkách ML2. TGFβ1 významně zvýšil apoptózu v ML2 buňkách, ne však v ML2 buňkách ošetřených SB431542, specifickým inhibítoem ALK4, 5, 7.

Bortezomib (10nM) indukoval apoptózu u buněčných leukemických linií Kasumi1, CTV1, ML2, ale ne u buněk ML1. Buňky linie Kasumi1 a ML2 byly také citlivé k indukci apoptózy vyvolané působením TGFβ1, ale v menší míře než u bortezomibu (obr.6,7,8).

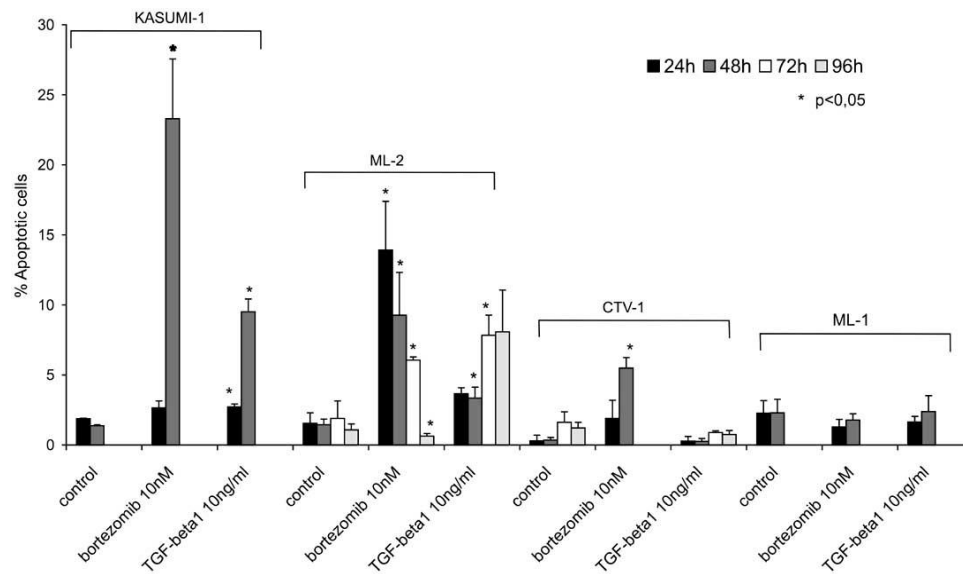
Obr.6 Detekce apoptózy buněk ML2 barvením annexinem V.



Identifikace apoptotické smrti buněk byla provedena dle návodu výrobce viz. část v materiálech a metodách. Získaná data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM (n=3). Signifikantní změny (pro p menší než 0,05) jsou označeny hvězdičkou.

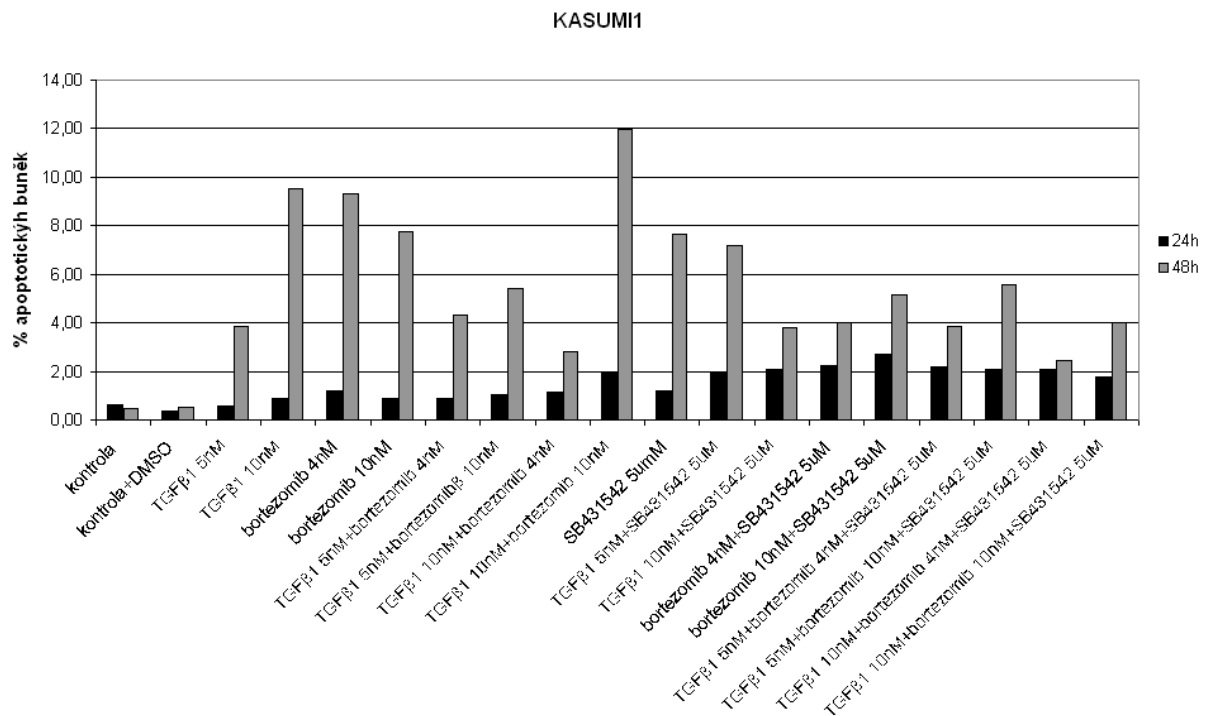
Bortezomib 10nM vyvolal největší apoptotickou odpověď u buněk CTV1, zatímco TGF β 1 byl nejúčinnější v indukci apoptózy u linie ML2. Použití kombinace bortezomibu a TGF β 1 zvýšilo apoptotický účinek proti samotnému bortezomibu u buněk linie ML2 na rozdíl od buněk ML1 a CTV1. Proapoptotický účinek bortezomibu byl navozen již v čase 24h působení na rozdíl od apoptotického účinku TGF β 1, který vzrůstal v celém měřeném časovém intervalu 0-96h inkubace a byl značně menší. Buňky linie ML1 byly rezistentní proti oběma induktorům apoptózy (obr.6-8).

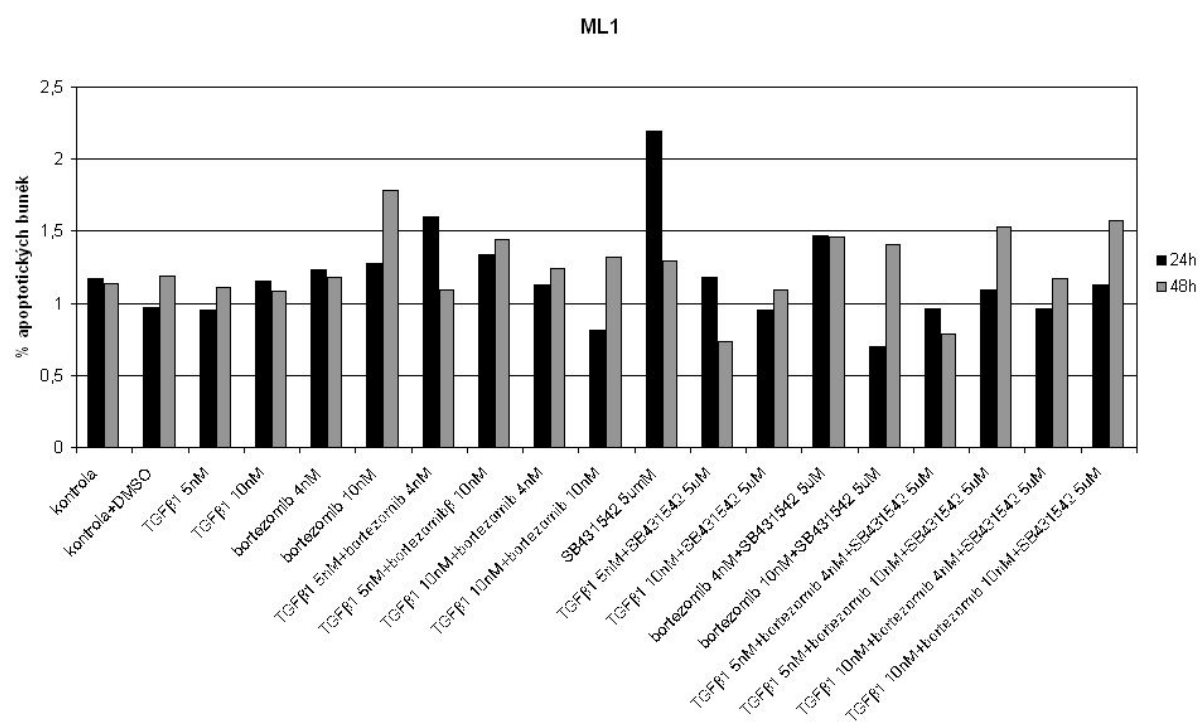
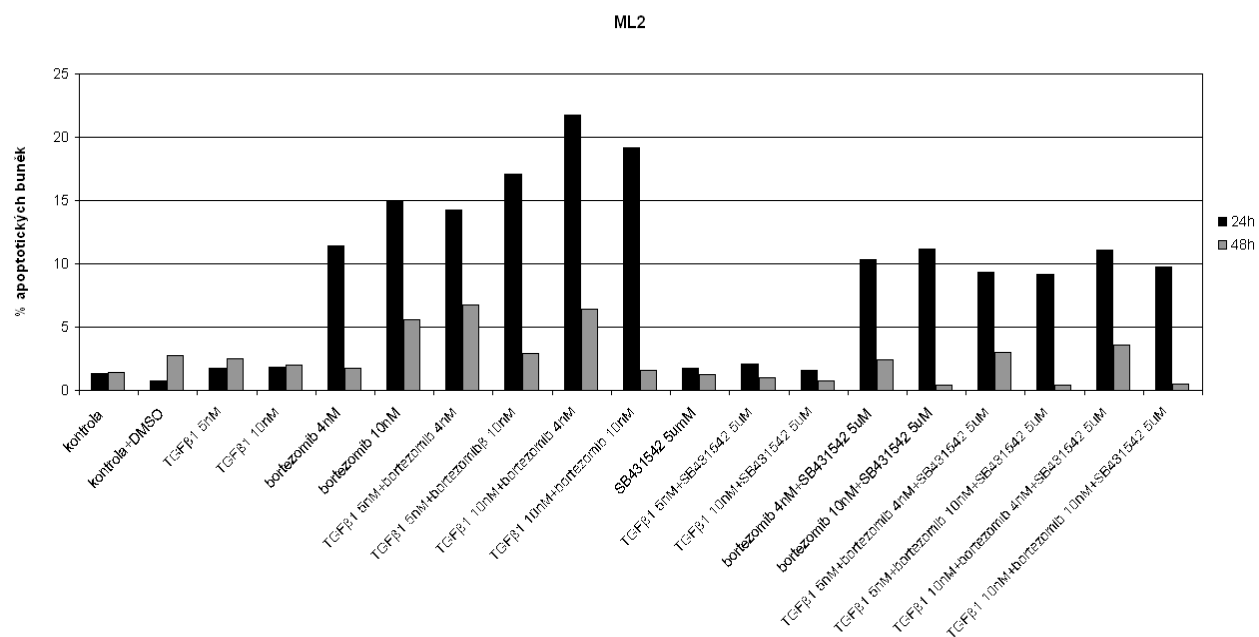
Obr.7 Indukce apoptózy bortezomibem a TGFβ1 v buněčných liniích Kasumi1, ML2, CTV1 a ML1.

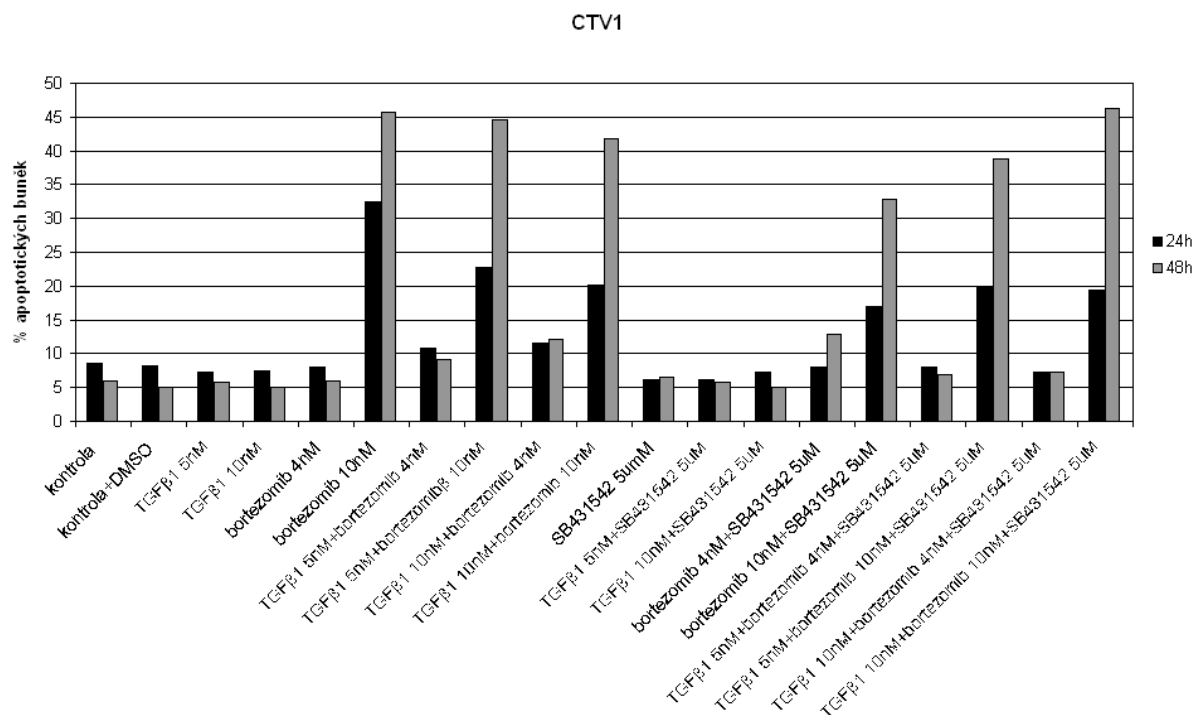


Buňky byly preinkubovány 24-96 h bez (kontrola) nebo s bortezomibem (10 nM) nebo s TGFβ1 (10 ng/ml).

Obr.8 Indukce apoptózy bortezomibem a TGFβ1 v buněčných liniích Kasumi1, ML2, CTV1 a ML1.



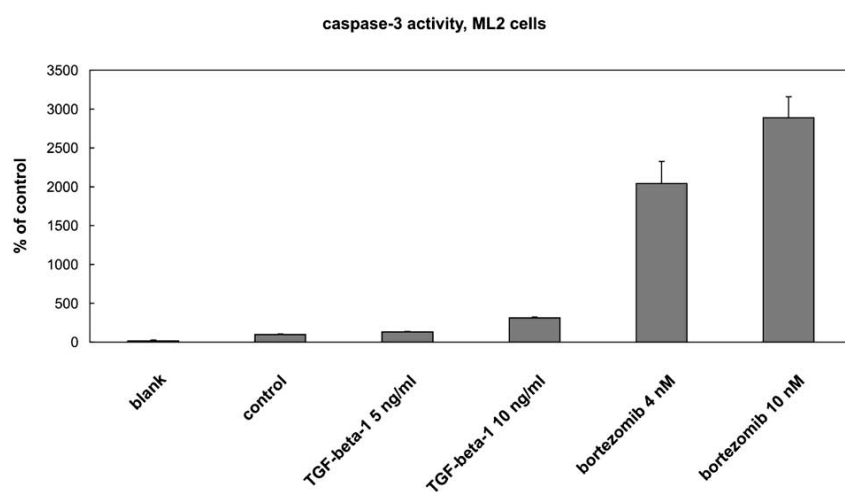




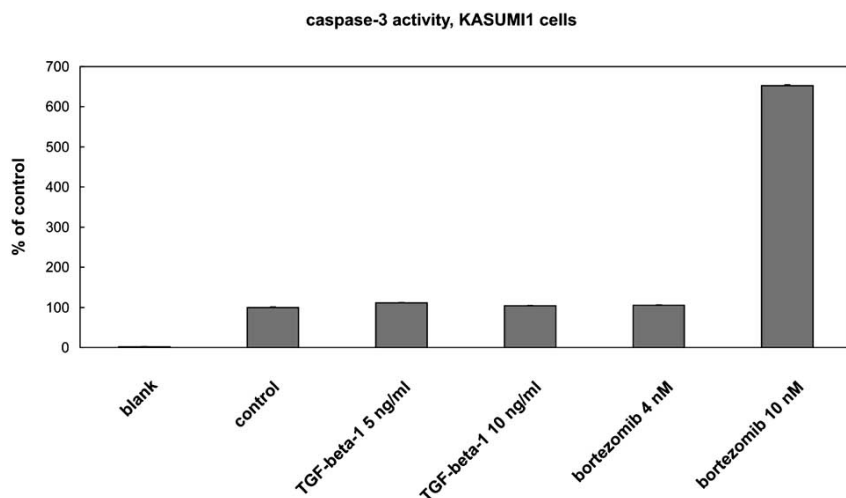
Analýza buněčného cyklu

Bortezomib o různých koncentracích (4nM nebo 10nM) indukoval po působení 24h kaspázu-3 v buňkách ML2 (obr.9), ale jenom 10nM bortezomib indukoval kaspázu-3 po 48h v buňkách linie Kasumi1 (obr.10).

Obr.9 Aktivita kaspázy-3 v buňkách ML2 inkubovaných 24h bez (kontrola) nebo s bortezomibem (4nM or 10 nM) nebo s TGFβ1 (10 ng/ml or 20 ng/ml).



Obr.10 Aktivita kaspázy-3 v buňkách Kasumi1 inkubovaných 48h bez (kontrola) nebo s bortezomibem (4nM or 10 nM) nebo s TGFβ1 (5 ng/ml or 10 ng/ml).



Regulace exprese signalizačních komponent (TGFβ1 receptorů a Smad proteinů) a vybraných genů signalizační dráhy TGFβ1 v buňkách ML2. Účinek inhibitorů MAPK, proteazomů a histondeacetyláz na tuto expresi.

Tab.7 Účinek TGFβ1, monoklonální protilátky proti TGFβ1, MAPK inhibitorů a SB202474 (negativní kontrola p38 MAPK inhibičních studií) na hladinu mRNA signalizačních složek (TGFβ1 receptory a Smad proteiny) a na hladinu mRNA vybraných genů ze signalizační kaskády TGFβ1 v buněčné linii ML2.

Description	Intensity of genes expression (%) (24h)							
	Control (untreated cells)	TGFβ1 (5ng/ml)	TGFβ1 (10 ng/ml)	TGFβ1 monoclonal antibody (20μg/ml)	UO126 (5μM)	PD98059 (10μM)	SB 203580 (5μM)	SB 202474 (5μM)
ALK1	100	96	115	40 ↓*	83	121	108	89
TβRI (ALK5)	100	52 ↓*	144 ↑*	99	18 ↓*	54 ↓*	19 ↓*	18 ↓*
TβRII	100	131 ↑*	313 ↑*	260 ↑*	94	100	76 ↓*	150 ↑*
Smad1	100	91	87	98	107	126 ↑*	89	130 ↑*
Smad2	100	102	96	105	87	134	99	133
Smad3	100	93	111	93	88	81	115	76
Smad4	100	74 ↓*	204 ↑*	83	84	135 ↑*	248 ↑*	116
Smad5	100	67 ↓*	122 ↑*	70 ↓*	83	x	132 ↑*	x
Smad7	100	109	115	102	90	120	108	138 ↑*
Id1	100	60 ↓*	55 ↓*	73 ↓*	157 ↑*	193 ↑*	265 ↑*	135 ↑*
JunB	100	185 ↑*	308 ↑*	100	61 ↓*	100	102	115
p21 ^{Waf1/Cip1}	100	201 ↑*	159 ↑*	1750 ↑*	86	104	262 ↑*	117
p27 ^{Kip1}	100	105	124 ↑*	100	78 ↓*	37 ↓*	91	93
cdc25A	100	95	85	125 ↑*	77 ↓*	112	107	100
VEGF	100	81	83	56 ↓*	56 ↓*	90	81	107
RhoA	100	95	107	129 ↑*	122 ↑*	162 ↑*	113	172 ↑*
PAI-1	100	769 ↑*	627 ↑*	62 ↓*	130 ↑*	2091 ↑*	488 ↑*	171 ↑*

IL6	100	0 ↓*	0 ↓*	x	0 ↓*	0 ↓*	0 ↓*	0 ↓*
SnoA	100	310 ↑*	326 ↑*	253 ↑*	437 ↑*	243 ↑*	622 ↑*	224 ↑*
SnoN	100	492 ↑*	887 ↑*	104	576 ↑*	269 ↑*	440 ↑*	85
c-myc	100	63 ↓*	60 ↓*	81	82	26 ↓*	91	146 ↑*
TfR1	100	83	72 ↓*	x	48 ↓*	20 ↓*	76 ↓*	270 ↑*

↓ snížení

↑ zvýšení

* statisticky významné (p<0,05)

x experiment neproveden

Tab.8 Účinek specifických inhibitorů (SB431542) ALK4, 5, 7, PI3K inhibitoru (LY294002) a inhibitorů proteazomu na hladinu mRNA komponent signální dráhy TGFβ1 (TGFβ1 receptory, Smad proteiny) a na hladinu mRNA vybraných cílových genů TGFβ1 v buněčné linii ML2.

Description	Intensity of genes expression (%) (24h)						
	Control (untreated cells)	SB431542 (5μM)	LY294002 (25μM)	Proteazome inh. 1 (2.5μM)	Proteazome inh. 2 (2.5μM)	MG132 (0.5μM)	Bortezomib (10nM)
ALK1	100	79 ↓*	43 ↓*	12 ↓*	14 ↓*	10 ↓*	9 ↓*
TβRI (ALK5)	100	67 ↓*	92	45 ↓*	4 ↓*	83	80 ↓*
TβRII	100	34 ↓*	164	6 ↓*	3 ↓*	203 ↑*	34 ↓*
Smad1	100	83	78 ↓*	32 ↓*	75 ↓*	85	x
Smad2	100	84	97	32 ↓*	47 ↓*	55 ↓*	x
Smad3	100	98	99	5 ↓*	14 ↓*	143 ↑*	x
Smad4	100	153 ↑*	119	4 ↓*	15 ↓*	125 ↑*	x
Smad5	100	78 ↓*	105	2 ↓*	0 ↓*	x	x
Smad7	100	111	108	96	48 ↓*	100	68 ↓*
Id1	100	163 ↑*	131 ↑*	105	35 ↓*	250 ↑*	29 ↓*
JunB	100	101	86	108	28 ↓*	106	47 ↓*
p21 ^{Waf1/Cip1}	100	75 ↓*	113	75 ↓*	47 ↓*	1154 ↑*	332 ↑*
p27 ^{Kip1}	100	73 ↓*	141 ↑*	27 ↓*	0 ↓*	462 ↑*	13 ↓*
cdc25A	100	75 ↓*	57 ↓*	6 ↓*	11 ↓*	74 ↓*	162 ↑*
VEGF	100	80	46 ↓*	10 ↓*	13 ↓*	242 ↑*	6 ↓*
RhoA	100	107	97	3 ↓*	205 ↑*	336 ↑*	19 ↓*
PAI-1	100	145 ↑*	212 ↑*	4770 ↑*	12499 ↑*	1458 ↑*	402 ↑*
IL6	100	0 ↓*	0 ↓*	388 ↑*	9063 ↑*	803 ↑*	918 ↑*
SnoA	100	290 ↑*	651 ↑*	163 ↑*	57 ↓*	128 ↑*	326 ↑*
SnoN	100	67 ↓*	316 ↑*	23 ↓*	13 ↓*	105	78 ↓*
c-myc	100	88	78 ↓*	0 ↓*	34 ↓*	113	96
TfR1	100	47 ↓*	28 ↓*	2 ↓*	0 ↓*	9 ↓*	5 ↓*

↓ snížení

↑ zvýšení

* statisticky významné (p<0,05)

x experiment neproveden

Buňky ML2 byly inkubovány bez TGFβ1 (kontrola) nebo s TGFβ1 a jinými látkami po 24 hodin. Byla připravena cDNA z celkové RNA izolované z buněk a určeno množství specifických mRNA. Výsledky jsou v tabulách 7-9. Všechny složky signální dráhy TGFβ1 jsou exprimovány v buňkách ML2 a jsou snadno detekovatelné na úrovni mRNA.

Navíc, většina studovaných cílových genů TGF- β 1 (plasminogen activator inhibitor-1 PAI-1, JunB, p21Waf1/Cip1, c-myc, Id1, SnoN) je exprimována, jak bylo předpokládáno [49,52,109-112]. Ošetření buněk ML2 TGF β 1 po dobu 24 hodin významně zvýšilo hladinu mRNA pro T β RII, PAI-1, JunB, p21Waf1/Cip1, SnoA, SnoN a snížilo hladinu mRNA pro c-myc, Id1. Žádný účinek TGF- β 1 nebyl zjištěn u genů pro RhoA, cdc25A, VEGF. Naše výsledky ukazují, že signální kaskáda TGF β 1 jako regulátor transkripce je v buňkách ML2 intaktní. Hladina mRNA pro IL6 nebyla detekovatelná po ošetření buněk TGF β 1, zato hladina mRNA významně vzrostla při použití inhibitorů proteazomu a inhibitorů histondeacetyláz (HDA) s výjimkou 1mM butyrátu sodného. Hladina mRNA pro transferrin receptor 1 (TfR1) byla mírně snížena účinkem TGF β 1 (tab.7). Toto snížení mohlo být nicméně způsobeno také jiným mechanismem, protože SB431542 (specifický inhibitor Alk 4, 5, 7) redukuje hladinu mRNA pro TfR1 dokonce ještě více než TGF β 1 (tab.8). Exprese TfR1 byla účinně tlumena inhibitory proteazomů a inhibitory HDA (tab.8,9). Inhibitory proteazomů, inhibitory HDA a desferal (dfroxamine, chelátor železa) zvýšily hladinu mRNA pro PAI-1 (tab.7,8). Některé inhibitory proteazomů (MG132, bortezomib) zvýšily také hladinu mRNA pro p21 (tab.7). Exprese genu c-myc je velmi redukována inhibitory HDA a desferalem.

Tab.9 Účinek inhibitorů HDA a desferalu na hladiny mRNA složek signální dráhy TGF β 1 (TGF β 1 receptorů a Smad proteinů) a na hladiny mRNA vybraných cílových genů TGF β 1 v buněčné linii ML2.

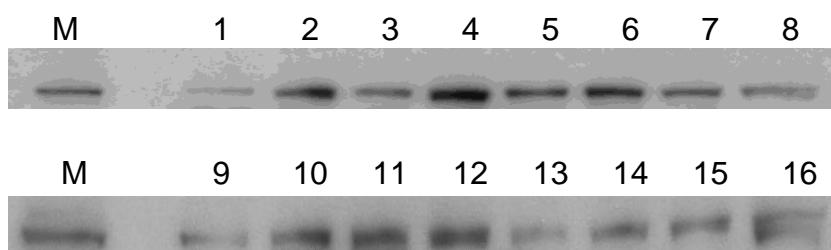
Description	Intensity of genes expression (%) (24h)						
	Control (untreated cells)	HDAI1 (0,5 μ M)	HDAI2 (5 μ M)	HDAI3 (2 μ M)	Apicidin (1 μ M)	Butyrate (1mM)	Desferal (0,1mM)
ALK1	100	90	58	56 ↓*	40 ↓*	x	43 ↓*
T β RI (ALK5)	100	63 ↓*	29 ↓*	3 ↓*	42 ↓*	7 ↓*	163 ↑*
T β RII	100	32 ↓*	236 ↑*	63 ↓*	133	186	147 ↑*
Smad1	100	92	86	94	27 ↓*	93	68 ↓*
Smad2	100	96	98	110	101	96	122
Smad3	100	37 ↓*	41 ↓*	45 ↓*	30 ↓*	33 ↓*	27 ↓*
Smad4	100	55 ↓*	118	47 ↓*	71 ↓*	40 ↓*	127
Smad5	100	62 ↓*	90	63 ↓*	44 ↓*	52 ↓*	5 ↓*
Smad7	100	91	72 ↓*	41 ↓*	78 ↓*	48 ↓*	101
Id1	100	74 ↓*	297 ↑*	171 ↑*	83 ↓*	153 ↑*	125 ↑*
JunB	100	70 ↓*	88	84	128	87	129
p21 ^{Waf1/Cip1}	100	116	419 ↑*	75	214	116	924 ↑*
p27 ^{Kip1}	100	17 ↓*	34 ↓*	48 ↓*	5 ↓*	39 ↓*	76 ↓*
cdc25A	100	108	94	89	130	85	122
VEGF	100	64 ↓*	137 ↑*	151 ↑*	192 ↑*	100	157 ↑*
RhoA	100	154 ↑*	209 ↑*	1 ↓*	2 ↓*	0 ↓*	0 ↓*
PAI-1	100	552 ↑*	848 ↑*	961 ↑*	1474 ↑*	796 ↑*	6888 ↑*
IL6	100	73	648 ↑*	4162 ↑*	3357 ↑*	0 ↓*	199 ↑*
SnoA	100	117	998 ↑*	174 ↑*	315 ↑*	21 ↓*	0 ↓*
SnoN	100	62 ↓*	503 ↑*	97	112	21 ↓*	144 ↑*
c-myc	100	40 ↓*	21 ↓*	3 ↓*	0 ↓*	21 ↓*	4 ↓*

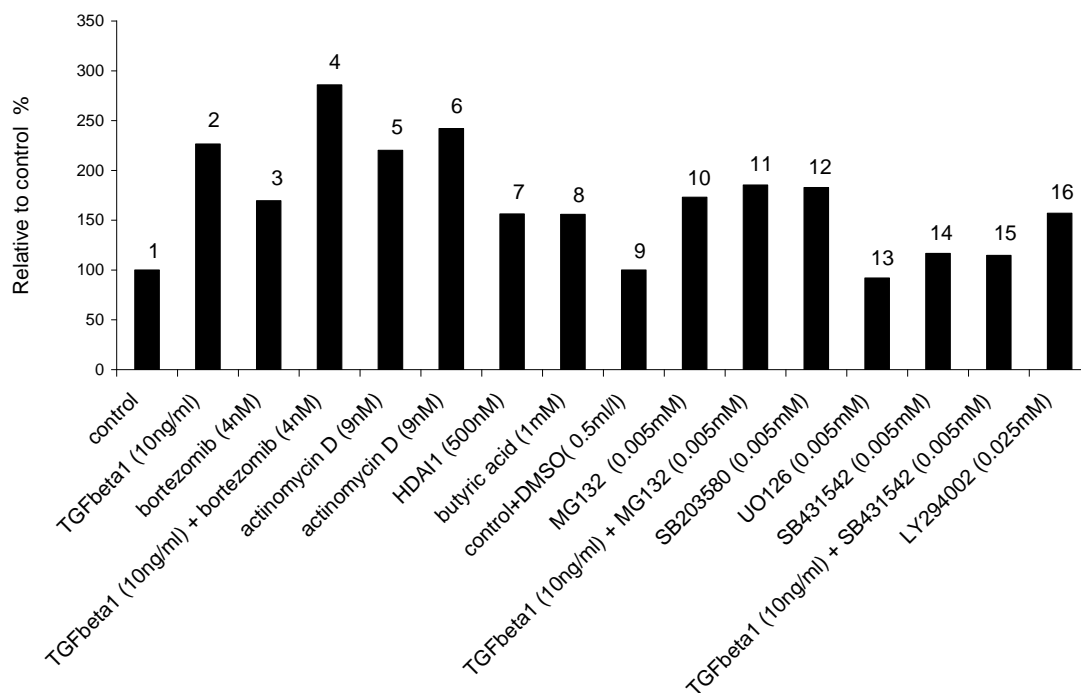
TfR1	100	26 ↓*	5 ↓*	2 ↓*	23 ↓*	6 ↓*	194 ↑*
<hr/>							
↓ snížení							
↑ zvýšení							
* statisticky významné (p<0,05)							
x experiment neproveden							

Western blot - analýza hladin proteinů v buněčné linii ML2

Abychom zjistili, zda je SnoN zvýšené v buňkách ML2 po přidání TGFβ1 i na úrovni proteinu, provedli jsme western blot analýzu (obr.11). Zjistili jsme zvýšenou hladinu SnoN po inkubaci TGFβ1 s buňkami ML2 po 24 h. Z našich výsledků vyplývá, že zvýšené množství SnoN negativně ovlivňuje signalizační dráhu TGFβ1 v buněčné linii ML2 a podílí se na resistenci buněk ML2 k inhibičnímu účinku TGFβ1 na proliferaci (obr.12). V buňkách ML2 ošetřených po dobu 24 hodin TGFβ1 jsme dále chtěli pomocí western blotu detekovat klíčové složky regulace buněčného cyklu, jakými jsou inhibitory cyklin-dependentních kináz p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1}, které ovšem nebyly detekovány (výsledky nejsou zobrazeny). Nefunkčnost regulace buněčného cyklu je jedním z kritických bodů, který v buňkách zapříčiňuje nekontrolovatelnou proliferaci resistantní k inhibičnímu účinku TGFβ1.

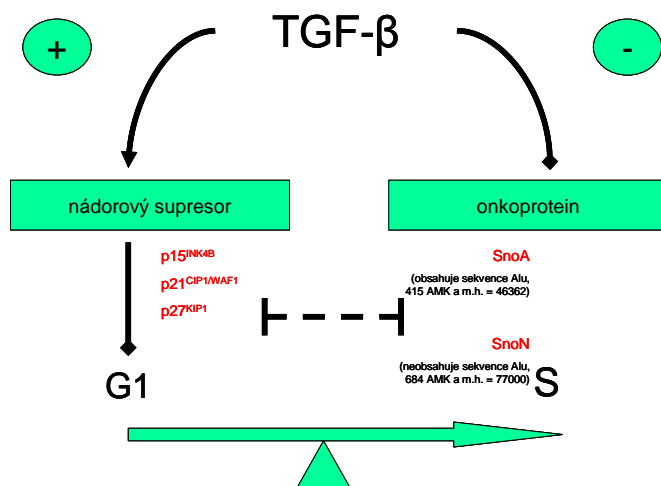
Obr.11 Western blot - exprese SnoN v buňkách ML2.





ML2 buňky byly inkubovány bez (kontrola) nebo s přidavkem TGFβ1 10 ng/ml/ nebo jiných látek po dobu 24 hodin. Buňky byly po této době sklizeny, promyty, lyzovány a byla provedena Western blot analýza. M označuje pozitivní kontrolu (SnoN protein v jaderném extraktu z HeLa buněk).

Obr.12 Vliv TGFβ1 na regulaci přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu.



TGFβ1 zvyšuje syntézu a aktivitu nádorových supresorů, proteinů p15^{INK4B}, p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1}, které inhibují proliferaci a drží buňky uvězněné v G1 fázi buněčného cyklu. TGFβ1 v případě ML2 buněk sice stimuluje syntézu výše uvedených nádorových supresorů, ale stimuluje i syntézu a tím zřejmě i aktivitu onkoproteinů SnoA/SnoN. Výsledkem je rezistence buněk ML2 na inhibiční účinek TGFβ1 na proliferaci.

Expres a sekvenování signálních komponent TGFβ1 (receptorů a Smad proteinů) u pacientů s MDS a AML

Expres jednotlivých signálních složek dráhy TGFβ1 byla sledována také u pacientů s MDS a AML. Celkem jsme vyšetřili 198 MDS pacientů a 73 pacientů s AML, z nichž každý měl aspoň u jednoho cílového genu TGFβ1 sníženou expresi.

Část těchto pacientů byla také podrobena sekvenační analýze – sekvenovali jsme jednotlivé exony genů pro signální komponenty dráhy TGFβ. Celkem jsme analyzovali tento počet pacientů s MDS nebo AML: 42 pacientů na Smad4, 22 pacientů na Smad2, 20 pacientů na TβRI, 20 pacientů na TβRII. Neprokázali jsme žádnou mutaci v kódujících oblastech uvedených genů signální dráhy TGFβ1, ale zjistili jsme sníženou nebo nedetekovatelnou expresi analyzovaných genů (viz. následující tabulka 10). Snížená expres je zřejmě způsobena epigenetickými změnami, tedy hypermetylací a deacetylací promotorových oblastí těchto genů.

Tab.10 Snížená nebo nulová expres hladin mRNA genů signální dráhy TGFβ u pacientů s MDS a AML

komponenty TGFβ1	snížená nebo nulová expres (% případů)	snížená nebo nulová expres (% případů)
	pacienti MDS	pacienti AML
Smad1	23%	26%
Smad2	33%	11%
Smad3	37%	34%
Smad4	35%	31%
Smad5	42%	47%
TβRI (ALK5)	47%	40%
TβRII	51%	67%
ALK1	38%	50%

EVII, ERG, MN1 – real time PCR

Analyzovali jsme expresi hladin mRNA pro geny EVII, ERG a MN1 u pacientů s diagnózou MDS nebo AML metodou kvantitativní PCR v čase. Pacienti s MDS byly vyšetřeni pouze na expresi EVII, jehož zvýšená hladina mRNA je spojována se špatnou prognózou. U pacientů s AML je spojována se špatnou předpovědí pro léčbu zvýšená hladina mRNA EVII, ERG i MN1, proto byly vyšetřeni na všechny tři faktory.

Celkem jsme vyšetřili 556 vzorků pacientů s různým typem MDS nebo podezřením na MDS a 436 vzorků pacientů v různém stadiu AML nebo s podezřením na tuto leukémii. Ze 485 vzorků s prokázaným MDS mělo 90 zvýšenou expresi EVI1 a ze 71 vzorků se suspektním MDS byla zjištěna zvýšená exprese EVI1 u 11 případů (tab.11). Pacienti s AML měli také zvýšenou expresi EVI1 a to u 62 vzorků ze 436, dvojnásobné množství mělo zvýšenou expresi ERG a u více jak dvojnásobného počtu byla zjištěna overexprese MN1 (tab.10). Častější byly tedy u pacientů s AML zvýšené exprese hladin mRNA pro ERG a MN1 (tab.10). Počet pacientů s normálním karyotypem byl zhruba stejný jako počet pacientů se změněným karyotypem u AML (245 pacientů s normálním a 231 pacientů s chromozómalními přestavbami). U pacientů s MDS převažoval normální karyotyp –(80 pacientů oproti 56 pacientům s chromozómalními přestavbami), nepočítáme-li pacienty se zvláštním typem MDS 5q- (včetně delece 5q- jsme měli 132 pacientů se změněným karyotypem). Výskyt zvýšené exprese rizikových faktorů EVI1, ERG a MN1 byl podobný u pacientů s normálním i změněným karyotypem, s výjimkou EVI1 u MDS (tab.12).

Tab.11 Počet případů nalezených overexpresí EVI1, ERG a MN1 u pacientů s MDS a AML

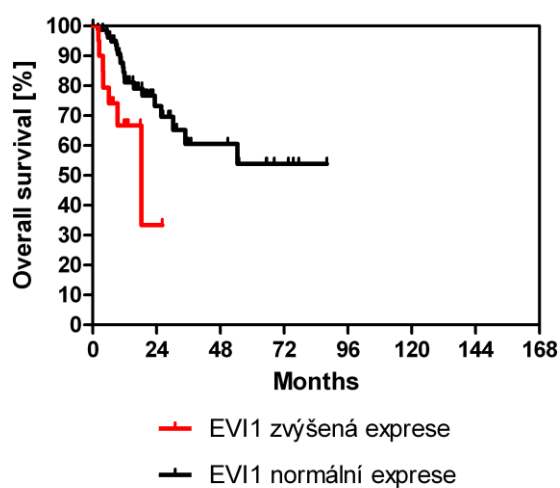
onemocnění	počet analyzovaných vzorků	počet případů (%) zvýšené mRNA EVI1	počet případů (%) zvýšené mRNA ERG	počet případů (%) zvýšené mRNA MN1
susp.MDS	71	11 (15%)	-	-
prokázaný MDS	485	90 (19%)	-	-
susp.AML	5	2 (40%)	2 (40%)	0
prokázaný AML	431	62 (14%)	113 (26%)	126 (29%)

Tab.12 Procento případů nalezených overexpresí EVI1, ERG a MN1 u pacientů s MDS a AML podle karyotypu

	MDS	AML		
	EVI1	EVI1	ERG	MN1
normální karyotyp	7,5%	17,9%	31%	41,6%
změněný karyotyp	18,9%	17,1%	35,0%	47,0%

Ze získaných dat byly sestaveny křivky přežití porovnávající délku života pacientů se zvýšenou expresí a s normální expresí mRNA uvedených prognostických faktorů (obr.13-20).

Obr.13 Graf přežití pacientů s MDS podle exprese EVI1

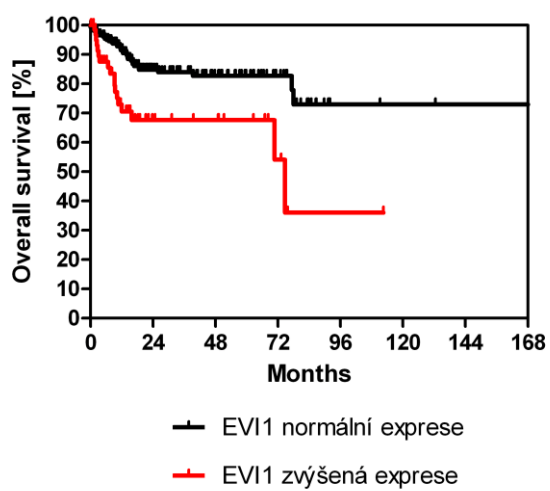


počet pacientů s normální expresí EVI1 – 79

počet pacientů se zvýšenou expresí EVI1 – 20

$p = 0,0211$

Obr.14 Graf přežití pacientů s AML podle exprese EVI1

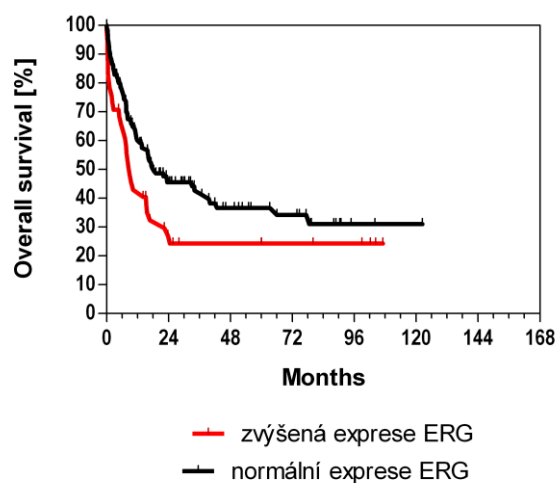


počet pacientů s normální expresí EVI1 (norm.EVI1 mRNA) – 268

počet pacientů se zvýšenou expresí EVI1 (zvýšené EVI1 mRNA) – 65

$p = 0,0003$

Obr.15 Graf přežití pacientů s AML podle exprese ERG

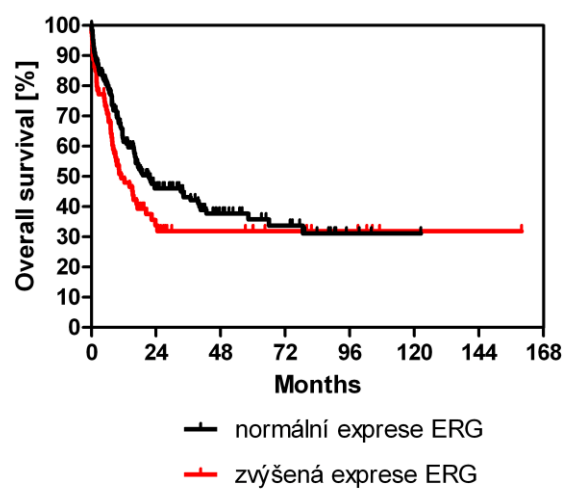


počet pacientů s normální expresí ERG – 141

počet pacientů se zvýšenou expresí ERG – 41

$p = 0,0365$

Obr.16 Graf přežití pacientů s AML a overexpresí MN1 podle exprese ERG

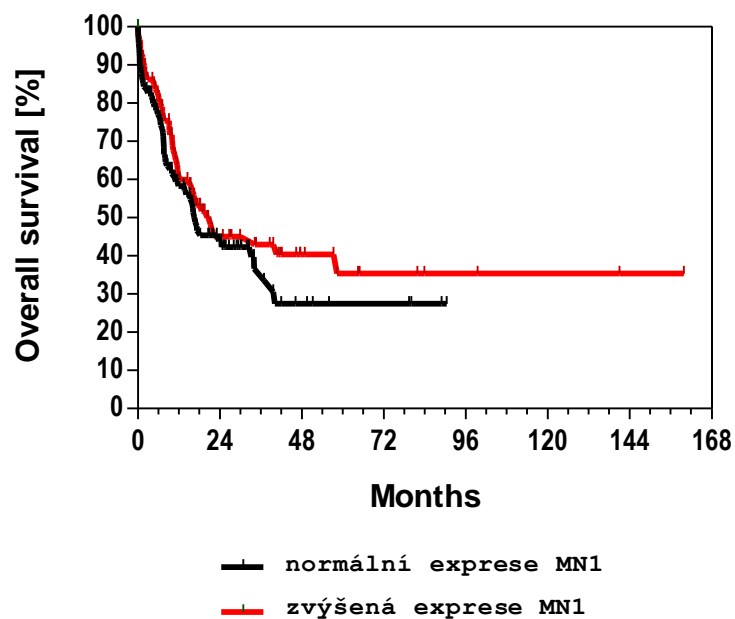


počet pacientů se zvýšenou expresí MN1 a s normální expresí ERG – 188

Počet pacientů se zvýšenou expresí MN1 a se zvýšenou expresí ERG – 79

$p = 0,1805$

Obr.17 Graf přežití pacientů s AML podle exprese MN1

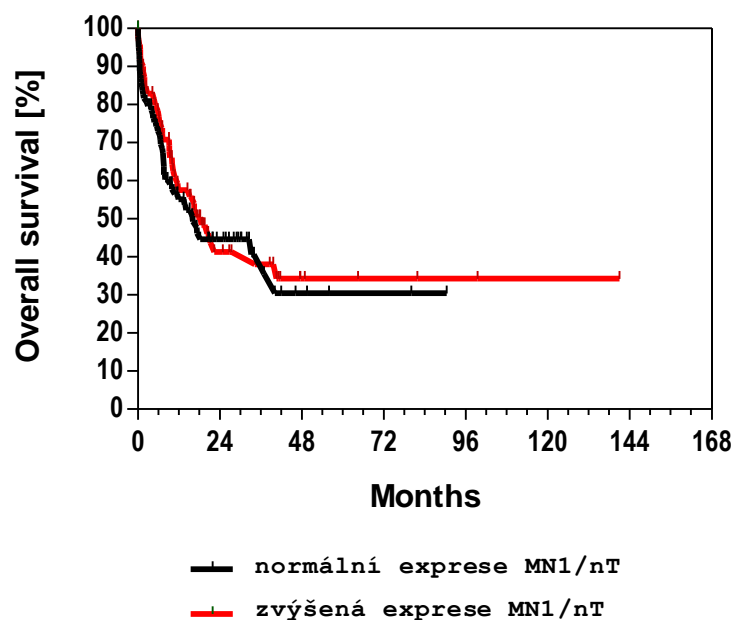


počet pacientů s normální expresí MN1 – 116

počet pacientů se zvýšenou expresí MN1– 88

p= 0,2796

Obr.18 Graf přežití pacientů s AML podle exprese MN1

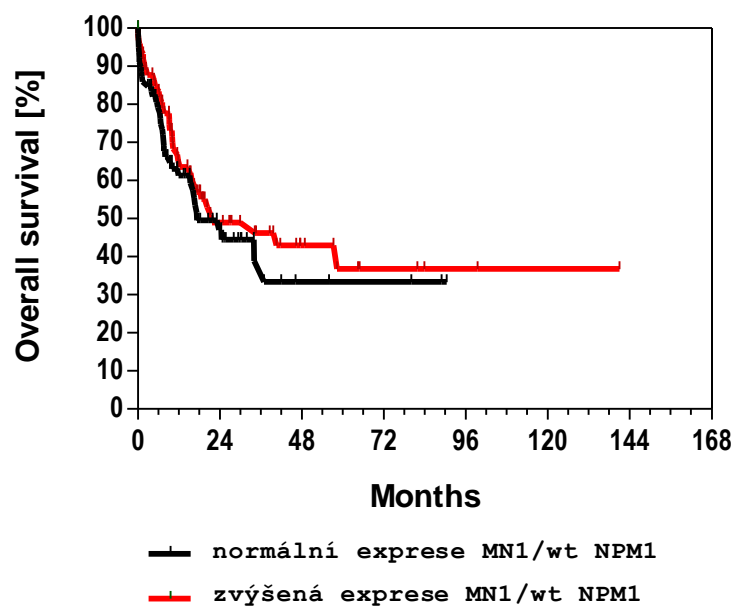


počet netransplantovaných pacientů s normální expresí MN1 – 99

počet netransplantovaných pacientů se zvýšenou expresí MN1 - 71

p= 0,6221

Obr.19 Graf přežití pacientů s AML podle exprese MN1

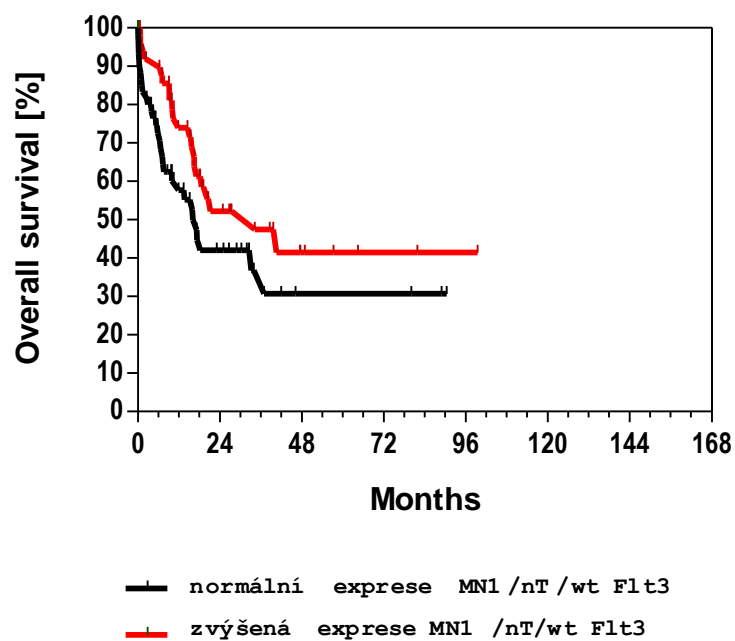


počet pacientů s normální expresí MN1 a bez mutace v NPM1 – 60

počet pacientů se zvýšenou expresí MN1 a bez mutace v NPM1 - 50

p= 0,4296

Obr.20 Graf přežití pacientů s AML podle exprese MN1



počet netransplantovaných pacientů s normální expresí MN1 a bez mutace v FLT3 – 60
počet netransplantovaných pacientů se zvýšenou expresí MN1 a bez mutace v FLT3 - 50
 $p = 0,0765$

Křivky přežití jsou znázorněny jako schody – každé úmrtí je zobrazeno jako pokles křivky. Tyto grafy byly zpracovány v programu GraphPadPrism.

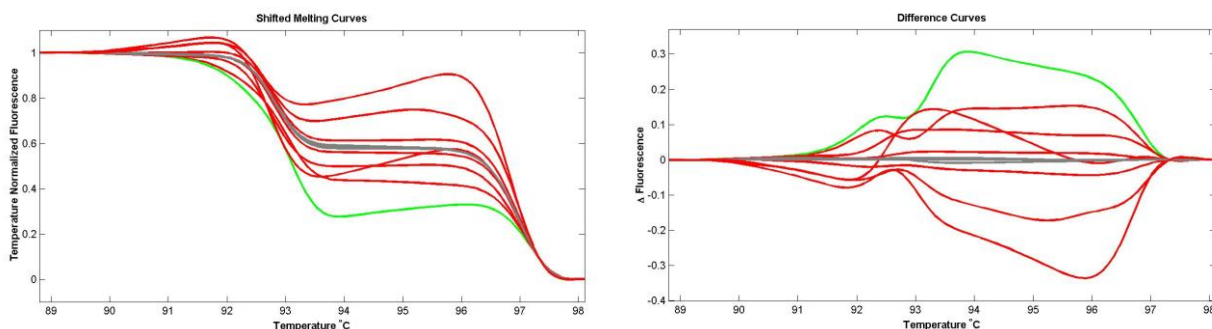
Výsledky mutací FLT3 jsme získali od laboratoře MUDr. Schwarze (ÚHKT), se kterou naše laboratoř spolupracovala na vyšetření pacientů s AML. Výsledky analýzy týkající se mutací NPM1 jsem získala ve spolupráci s kolegou z laboratoře buněčné fyziologie Mgr. Kostečkou.

HRMA a sekvenování CEBPA

High-resolution melting analysis (HRMA) je účinná metoda pro detekci mutací umožňující rychle rozlišit negativní vzorky od pozitivních (mutovaných) pomocí PCR reakce a specifického fluorescenčního barviva LC Green plus. Výstupem analýzy jsou křivky tání, které pro zvýraznění rozdílů tvaru automaticky software zobrazí jako graf „temperature shifted curves“ - křivky srovnané (posunuté „shifted“) do bodu, kde je DNA plně denaturována; následuje analýza tvaru křivek a odečtení referenční křivky, tedy získání diferenčního grafu („difference curves“) (obr.21,22).

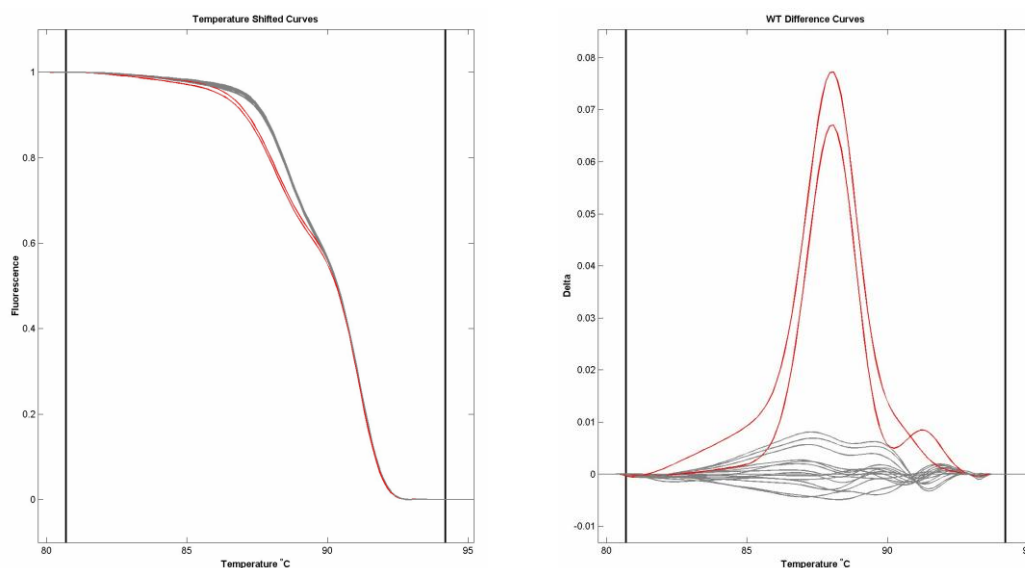
Efektivnost metody byla nejprve ověřena analýzou exonů genu MYH9 u sedmi pacientů s makrotrombocytopenií, kde se HRMA osvědčila jako účinná a spolehlivá metoda (obr.22) (41 vzorků z 280 PCR produktů bylo označeno jako odlišných od kontrol, u 5 byla nalezena mutace). Poté jsme HRMA použili také pro detekci mutací v genu CEBPA. Sekvenováním jsme ověřili, že HRMA není vhodná pro detekci mutací v genu CEBPA – falešná pozitivita dosáhla až 60% a rozdíl tvaru křivek tání mutovaných a nemutovaných vzorků nebyl natolik výrazný, aby bylo možné určit, které PCR produkty obsahují mutaci či polymorfismus (obr.21). Z porovnání s křivkami získanými z analýz MYH9 je patrný rozdíl (obr.21,22).

Obr.21 Křivky tání vzorků pacientů analyzovaných na mutace CEBPA v porovnání se vzorky zdravých jedinců



Vzorky detekované jako mutované jsou označeny červeně, případně zeleně, vzorky určené jako negativní na přítomnost mutace nebo polymorfismu jsou v grafu vyznačeny šedou barvou.

Obr.22 Křivky tání vzorků pacientů analyzovaných na mutace v genu MYH9 v porovnání se vzorky zdravých jedinců



Vzorky detekované jako mutované jsou označeny červeně, vzorky určené jako negativní na přítomnost mutace nebo polymorfismu jsou v grafu vyznačeny šedou barvou.

Sekvenováním jsme analyzovali 295 patientských vzorků na přítomnost mutace v genu CEBPA – 143 pacientů s MDS a 152 pacientů s AML. Z uvedeného počtu pacientů mělo pět s diagnózou MDS mutaci v genu CEBPA, polymorfismus byl detekován v genu CEBPA v 51 případech (tab.13,14). U pacientů s AML jsme detekovali ve 14 případech mutaci v CEBPA a u 42 pacientů s AML byl zjištěn polymorfismus.

Tab.13 Přehled vzorků pacientů analyzovaných na polymorfismy a mutace *CEBPA*

Pacienti/ kontroly	Počet	P1 ^a hom. ^e	P1 het. ^f	P2 ^b hom.	P2 het.	P3 ^c hom.	P3 het.	P4 ^d het.	Mutace het.
zdravé kontroly	41	0	0	0	1	1	6	2	0
AML	152	0	0	0	3	1	30	8	14
MDS	143	0	3	0	1	4	35	8	5

^a P1-polymorfismus 402 G>A podle GenBank Accesion No. NM_004364 a

993 G>A podle GenBank Accesion No. U34070

^b P2-polymorfismus 573 C>T podle GenBank Accesion No. NM_004364 a
1164 C>T podle GenBank Accesion No. U34070^c P3-polymorfismus 690 G>T podle GenBank Accesion No. NM_004364 a
1281 G>T podle GenBank Accesion No. U34070^d P4-polymorfismus 584-589dup podle GenBank Accesion No. NM_004364 a
1175-1180dup podle GenBank Accesion No. U34070^e homozygotní^f heterozygotní**Tab.14** Přehled nalezených mutací v genu *CEBPA* u pacientů s AML a MDS

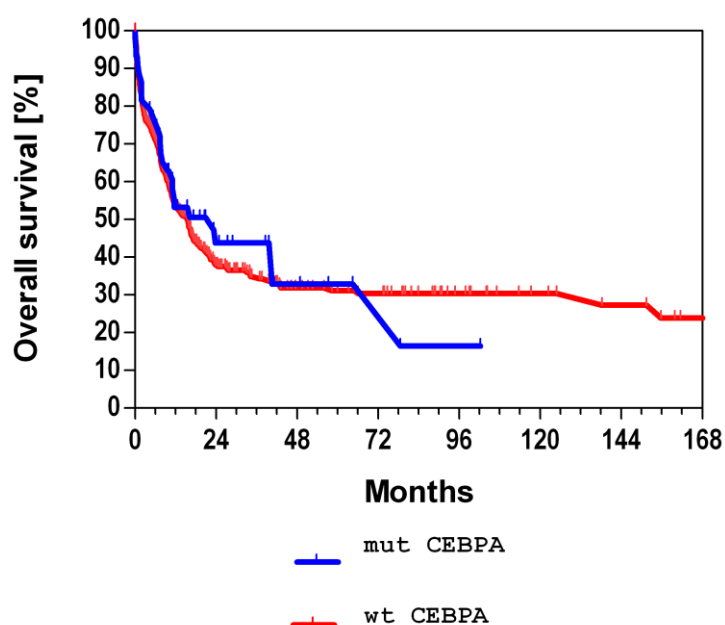
Pacient	Diagn- óza	věk/pohlaví	FAB	Cytogenetika	Mutace ^b	Mutace ^c	Změna aminokyselin	Komentář
14618	AML	63/F	ND	46,XX,inv(9)[22]	600_1055del	1191_1646del	H200_K352del insQ	Delece TAD2, DBD a ZIP
11858	AML	76/F	ND	41-45,XX,complex change of karyotype	924_925insTG	1515_1516insTG	E309fsX318	Změna čtecího rámce mezi DBD a ZIP, konec v ZIP
					638_1114del	1229_1705del	C213_A358delATG delX243	
10741	AML	79/F	ND	46,XX[22]	541del	1132del	Y181fsX316	Změna čtecího rámce mezi TAD1 and TAD2, konec mezi DBD a ZIP
B042	AML	48/F	M1	46,XX[13]	542_543insA	1133_1134insA	Y181X	konec mezi TAD1 a TAD2
10	AML	29/M	M1	46,XY,22p+[22]	68del	659del	P23fsX159	Změna čtecího rámce před TAD1, konec mezi TAD1 a TAD2
					912_929del	1503_1520del	Q305_T310del	Delece v DBD
8	AML	68/F	ND	46,XX[22]	68del	659del	P23fsX159	Změna čtecího rámce před TAD1, konec mezi TAD1 a TAD2
23	AML	56/M	ND	46,XY[22]	61A>G	652A>G	S32G	Substituce před TAD1
11460	AML	73/M	ND	ND	1038_1213del	1629_1804del	E347fsX363	Změna čtecího rámce v koncové oblasti a větší protein
					1037_1038insT	1629_1630insT		
15671	AML	80/M	ND	46,XY[10]/47,XY,+8[1]	260_411del	851_1002del	Q87fsX119	Změna čtecího rámce a konec v TAD2, delece TAD1
11710	AML	68/M	M4	46,XY[22]	392_393insA	983_984insA	Y131X	Stop between TAD1 and TAD2
					912_913insTTG	1503_1504insTTG	K304_Q305insL	Inserce v DBD
14747	AML	74/M	M4	46,XY[9]/47,XY,+8[13]	722_746 del	1313_1337del	L241fsX313	Změna čtecího rámce v DBD, konec mezi DBD a ZIP
15609	AML	67/M	M6	46,XY[16]/44-54,XY, heterodiploidie[4]	899 G>T	1490 G>T	R300L	Substituce v DBD
18	AML	61/M	ND	46,XY[22]	656_794del	1247_1385del	H219fsX272	Delece, změna čtecího rámce a konec mezi TAD1 a TAD2
15296	AML	50/F	M0	46,XX[5]	238_239insG	829_830insG	D80fsX107	Změna čtecího rámce a konec mezi TAD1 a TAD 2, terapií indukovaná mutace
15901	MDS	76/F	ND	ND	18_389del	609_980del	Y7_G130del	Delece TAD1
15523	MDS	25/F	ND	46,XX[18]	260_411del	851_1002del	Q87fsX119	Změna čtecího rámce a konec v TAD2, delece TAD1
15899	MDS	75/F	ND	ND	500_502del	1091_1093del	E167del	Delece mezi TAD1 a TAD2
15928	MDS	53/F	ND	ND	311_313del	902_904del	G104del	Delece in TAD1
12003	MDS- RAEB	60/F	ND	46,XX[22]	477_478insGTCCCCC	1068_1069insGTCCCCC	I160fsX171	Konec v TAD2
14849	MDS- RAEB	65/M	ND	46,XY[19]/47,XY,+8[3]	1069_1073del	1660_1664del	A358fs X420	Změna čtecího rámce v koncové oblasti a větší protein

^bGenBank Accession No. NM_004364.2, ^cGenBank Accession No. U_34070, ND - neurčeno
TAD = transactivation domain

Nalezli jsme celkem čtyři různé polymorfismy ve skupině českých pacientů s MDS a AML (tab.13). Nejčastěji se vyskytoval polymorfismus P3, který byl detekován jak u pacientů s MDS, tak i s AML a byl přítomen i v homozygotní formě. Nejvzácnějším typem polymorfismu nalezeným u pacientů byl P1 (tab.13). Kromě polymorfismů uvedených v tabulce 12 jsme našli také 25 druhů mutací v genu pro CEBPA (tab.14). Většina nalezených mutací byly delece v N-koncové a C-koncové oblasti. Tyto mutace nebyly zjištěny u žádného ze 41 zdravých kontrolních vzorků.

.

Obr.23 Křivka přežití pacientů s AML s mutací v CEBPA

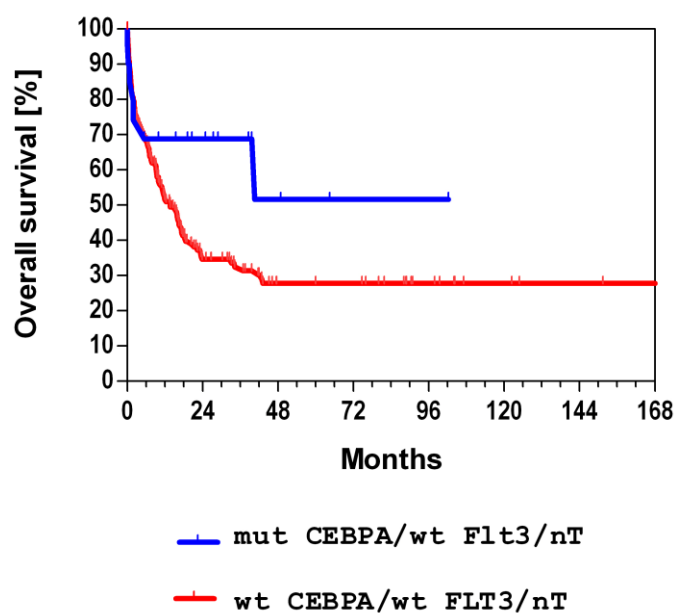


počet pacientů s AML bez mutace CEBPA - 292

počet pacientů s AML s mutací CEBPA - 43

p= 0,6750

Obr.24 Křivka přežití pacientů s AML s mutací v CEBPA, bez mutace ve FLT3

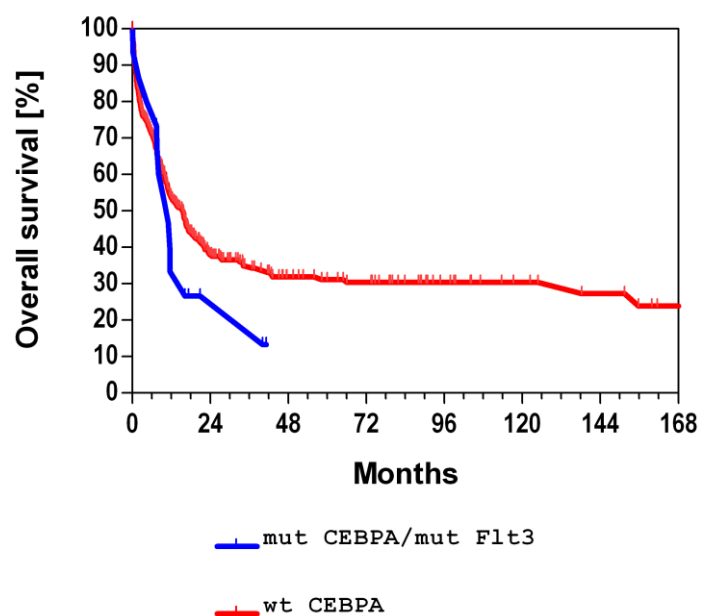


počet netransplantovaných pacientů s AML bez mutace CEBPA a bez mutovaného FLT3 - 169

počet netransplantovaných pacientů s AML s mutací CEBPA a bez mutovaného FLT3 – 20

p=0,0584

Obr.25 Křivka přežití pacientů s AML s mutací v CEBPA, s mutací ve FLT3



počet pacientů s AML bez mutace CEBPA - 292

počet pacientů s AML s mutací CEBPA a s mutovaným FLT3 – 15

p=0,2708

Jak ovlivňují mutace v genu pro *CEBPA* u pacientů s AML přežití jsou uvedeny společně se zjištěnými mutacemi *FLT3* (obr.23-25), neboť ITD mutace *FLT3* aktivují oblast s tyrosinkinázovou aktivitou receptoru FLT3 přes jeho dimerizaci a autofosforylaci a FLT3 fosforyluje a inaktivuje C/EBP α [10]. Mutace *FLT3*-ITD u pacientů jsme získali od laboratoře MUDr. Schwarze (ÚHKT), se kterou naše laboratoř spolupracovala na vyšetření pacientů s AML.

DISKUSE

V předešlých studiích jiných laboratoří byly zkoumány heterogenní odpovědi více než 10 lidských myeloidních buněčných linií na TGF β 1 [106-108]. Vliv TGF β 1 na ML2 buněčnou linii nebyl dosud zkoumán. Ukázali jsme, že buňky myelomonocytární line ML2 jsou odolné proti TGF β 1.

Rezistence proliferace buněk ML2 buněk na TGF β 1 není způsobena anti-apoptotickým účinkem TGF- β 1, který byl nalezen v lidských monocytárních leukemických buňkách U937 [113]. Jasně jsme ukázali slabý proapoptotický účinek TGF β 1 na buněčnou linii ML2, za který je zodpovědný receptor pro TGF β 1 I. typu - T β RI (ALK5), o čemž jsme se přesvědčili použitím specifického inhibitoru ALK5 (SB431542). TGF β 1 vyvolává zánik buňky pouze u určitých typů buněk, v určitém stadiu diferenciaci, přičemž velmi záleží na přítomnosti či nepřítomnosti jiných růstových faktorů v inkubačním médiu [114-115]. Všechny složky signální dráhy TGF β 1 (receptory a Smad proteiny) a všechny cílové geny této dráhy byly detekovány na úrovni mRNA v buňkách ML2. TGF β 1 nemá žádný signifikantní účinek na expresi těchto genů (*RhoA*, *cdc25A*, *VEGF*) v buněčné linii ML2. Nicméně, TGF β 1 stimuluje transkripci genu *VEGF* u jiných druhů buněk [116-117]. RhoA a jeho efektorová kináza p160^{Rock} přímo inhibují aktivitu *cdc25A* a tím navodí zastavení buněčného cyklu v epiteliálních buňkách ošetřených TGF β 1 [52]. Tedy signální dráha RhoA nezávislá na proteinech Smad je hlavní příčinou, proč TGF β 1 inhibuje buněčný cyklus v epiteliálních buňkách. Nedávno bylo zjištěno, že RhoA/ROCK dráha je nezbytná pro zvýšení p21^{Waf1/Cip1} a snížení c-myc proteinu [118]. Skutečnost, že hladina mRNA RhoA nereaguje na TGF β 1 v buňkách ML2, může také přispět k resistenci proliferace buněk ML2 na TGF β 1. SnoN je jaderný korepresor pro Smad4, který interaguje s ostatními transkripčními korepresory a HDAC [119,120]. Vzhledem k tomu, že jsme zjistili zvýšenou hladinu SnoN na úrovni proteinu po přidání TGF β 1, je možné, že se SnoN podílí na resistenci buněk ML2 na TGF β 1.

Ve většině buněk TGF β 1 indukuje degradaci SnoN [117,118]. Neschopnost TGF β 1 degradovat SnoN může vést k resistenci na inhibiční účinek TGF β 1 na buněčný cyklus [121]. Nicméně, inhibitory proteazomů a kombinace těchto inhibitorů s TGF β 1 zvyšují hladinu proteinu SnoN v buňkách ML2 ve větší míře než samotný TGF β 1. Přímý důkaz, že se SnoN podílí na resistenci buněk ML2 na proliferační účinek TGF β 1 může být dokázáno v dalších pokusech, zejména při použití stabilní antisense SnoN transfekce nebo anisomycinu [122,123]. Anisomycin, antibiotikum izolované z *Streptomyces griseolus*, je schopné snížit SnoN působením proteazomů ale mechanismem nezávislým na Smad a MAPK aktivaci [123]. Snížení SnoN přes tyto složky signalizační dráhy může vést k inhibici buněk ML2 na proliferační účinek TGF β 1.

Metodou western blot jsme nezachytili proteiny p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1} v buňkách ML2 bez TGF β 1 a po působení TGF β 1 24h. Tento fakt může také přispět k resistenci buněk ML2 na TGF β 1 indukovanou inhibici růstu. Protein p21^{Waf1/Cip1} je indukován v případě diferenciace buněk ML2 ale je nedetekovatelný v neindukovaných buňkách ML2 [124]. Inhibitor cyklin-dependentních kináz p21^{Waf1/Cip1} může být regulován post-transkripčně [125] a oba, p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1}, jsou nestabilními proteiny degradované proteazomech [126,127]. Metodou western blotu nebylo zjištěno detekovatelné množství těchto proteinů v buňkách ML2 ošetřených inhibitory proteazomů.

TGF β 1 inhibovalo syntézu DNA pouze v buňkách Kasumi1 ale u ostatních buněčných linií už ne. Bortezomib (10nM), jako potenciální inhibitor syntézy DNA u všech čtyř typů leukemických buněčných linií, indukoval apoptózu v největší míře u buněk CTV1, dále pak u Kasumi1 a ML2, ale ne u buněk ML1 (obr.7). Buňky linie Kasumi1 a ML2 byly také citlivé k indukci apoptózy vyvolané působením TGF β 1 (TGF β 1 byl nejúčinnější v indukci apoptózy u linie ML2), ale v menší míře než bortezomib. Kinetika apoptózy u jednotlivých buněčných linií byla rozdílná a apoptóza způsobená TGF β 1 byla slabší oproti bortezomibem vyvolané apoptózy. Proapoptotický účinek bortezomibu byl navozen již v čase 24h působení na rozdíl od apoptotického účinku TGF β 1, který vzrůstal v celém měřeném časovém intervalu 0-96h inkubace a byl značně menší. Bortezomib o různých koncentracích indukoval po působení 24h kaspázu-3 v buňkách ML2 (obr.9), ale jenom vyšší koncentrace bortezomibu indukovala kaspázu-3 po 48h v buňkách linie Kasumi1 (obr.10). Použití kombinace bortezomibu a TGF β 1 zvýšilo apoptotický účinek proti samotnému bortezomibu u buněk linie ML2 na rozdíl od buněk ML1 a CTV1. Buňky linie ML1 byly rezistentní proti oběma induktorům apoptózy (TGF β , bortezomib).

Naše výsledky ukazují antiproliferační a proapoptotický účinek bortezomibu v lidských AML buněčných liniích. Rozdílná citlivost lidských buněčných linií k TGFβ1 a bortezomibu odráží chování primárních leukemických buněk u pacientů, u nichž je velkým problémem různorodost onemocnění daná množstvím genetických změn a profily imunofenotypu. Použití inhibitorů proteazomů v terapii bude tímto limitováno.

V uplynulých letech vědci věnovali pozornost a snažili se nalézt molekulární markery, pomocí nichž by mohli předpovídat průběh onemocnění pacientů s AML a MDS. Jde především o pacienty s normálním karyotypem. Takovými negativními prognostickými markery jsou právě EVI1, ERG a MN1.

Analyzovali jsme stovky vzorků pacientů s MDS a AML na expresi mRNA genů EVI1, ERG a MN1 a kromě MN1 jsme potvrdili jejich klinický význam jako negativních prognostických faktorů u těchto hematologických malignit.

U pacientů s MDS jsme sledovali pouze zvýšenou expresi EVI1, která je u nich špatným prognostickým znakem a to jak u pacientů s normálním karyotypem, tak i u pacientů s chromozómními přestavbami [15-18]. Zvýšenou expresi jsme našli u 101 pacientů s prokázaným nebo suspektním MDS z 556 analyzovaných vzorků, tedy 18% pacientů bylo pozitivních na overexpresi EVI1. Tento počet je nižší oproti literatuře (29% [128]). U pacientů s AML mělo zvýšenou expresi EVI1 14% (64 z 436 vyšetřených pacientů). Zjištěné číslo se také neshoduje s údaji uváděnými v literatuře, kde obvykle dosahují okolo 8% [129]. Pokud jde o karyotyp, analyzovali jsme zhruba stejný počet pacientů s normálním i změněným karyotypem u AML, u MDS bylo více pacientů s normálním karyotypem, nepočítáme-li pacienty se zvláštním typem MDS 5q- (včetně delece 5q- jsme vyšetřili více pacientů MDS se změněným karyotypem). Uvedený počet pacientů u grafů s křivkami přežití neodpovídá celkovému množství analyzovaných, protože ne u všech pacientů byla známa cytogenetika. Zvýšená exprese mRNA zkoumaných prognostických faktorů byla nalezena ve stejné míře u obou skupin, s výjimkou EVI1 u pacientů s MDS, u kterých byla detekována zvýšená exprese EVI1 více u pacientů s různými chromozómními aberacemi. V délce přežití se příliš nelišili pacienti se zvýšeným EVI1 se změněným karyotypem od těch s normálním karyotypem: průměrná délka přežití pacientů s AML s normálním karyotypem byla 20 měsíců, AML s chromozómními přestavbami 18 měsíců; u MDS byl rozdíl o něco větší: MDS pacienti s normálním karyotypem měli průměrnou délku přežití 13 měsíců, MDS se změněným karyotypem 17 měsíců. EVI1 jako negativní prognostický marker vyšel statisticky signifikantní; pacienti se zvýšenou expresí mRNA pro EVI1 přežívali kratší dobu (obr.13,14).

Také u zvýšené exprese hladiny mRNA pro ERG se nám podařilo prokázat, že je špatným prognostickým znakem. Pacienti AML se zvýšenou expresí ERG přežívají kratší dobu oproti pacientům s normální expresí ERG (obr.15). Co se týká odlišnosti karyotypu při zvýšené expresi ERG, v tomto případě pacienti AML s normálním karyotypem přežívali v průměru 34 měsíců, s chromozómními přestavbami 25 měsíců. Podobné hodnoty jsme získali i u pacientů se zvýšeným MN1 (36 a 26 měsíců). Velkým překvapením byli AML pacienti, kteří měli zároveň se zvýšenou expresí ERG také zvýšenou expresi MN1, neboť jejich prognóza se v delším časovém období výrazně zlepšila (obr.16). Tyto výsledky naznačovaly, že MN1 u pacientů s AML by nemusel být negativním prognostickým faktorem, jak uvádí literatura [14,83-85], nýbrž pozitivním prognostickým znakem. Obrázky křivek přežití pacientů se zvýšenou expresí MN1 (obr.17-20) tuto hypotézu potvrzují, ikdyž nejsou statisticky významné, trend je z nich zřejmý – MN1 nevychází jako prognosticky špatný marker, pává naopak. Ve spojení s nepřítomností mutace NPM1 nebo především FLT3, je vliv MN1 vidět ještě lépe (obr.19-20).

Vzorky pacientů s MDS a především AML jsme analyzovali také na přítomnost mutace v genu CEBPA. Z důvodu analýzy velkého množství vzorků jsme chtěli využít metody high-resolution melting analysis (HRMA), což je rychlá technika detekce mutací schopná porovnáním vzorků pacientů se vzorky zdravých jedinců (kontrola) označit během pár minut vzorky pozitivní na přítomnost mutace, případně polymorfismu. Nemuseli bychom tedy sekvenovat všechny vzorky pacientů, ale pouze ty, které by HRM analýzou byly označeny jako odlišné od kontroly (vzorek bez mutace a polymorfismu v genu CEBPA). Účinnost a spolehlivost metody byla nejdříve ověřena skríníngem sedmi pacientů s makrotrombocytopenií na přítomnost mutace v genu MYH9 (obr.22). Odlišný gen byl zvolen proto, že laboratoř, kde testování HRMA probíhalo, se zaměřila na trombocytopenie. Vzorky označené jako mutované byly sekvenovány. Falešná pozitivita dosáhla sice téměř 13%, ale vzhledem k velkému počtu vzorků bylo toto procento akceptovatelné. Pokud bychom zaznamenali stejnou falešnou pozitivitu v případě mutačního skríníngu CEBPA, znamenalo by to osekvenování 38 vzorků navíc. Bohužel v případě analýzy vzorků na přítomnost mutace CEBPA dosáhla falešná pozitivita 60% a rozdíl tvaru křivek tání vzorků pacientů v porovnání s kontrolou, který by měl být zřejmý na první pohled, nebyl natolik výrazný, aby bylo možné určit, které PCR produkty obsahují mutaci či polymorfismus (obr.21). Selhání HRMA mohlo být způsobeno rozdělením amplifikovaných částí genu CEBPA na více PCR produktů (více než jeden proužek na gelu); u genu MYH9 byl přítomen vždy pouze jeden PCR produkt.

Oproti zvýšené expresi EVI1 a ERG, mutace v genu pro CEBPA jsou považovány za prognosticky příznivý faktor [130,131]. Pacienti AML s mutací/emi CEBPA dosahují srovnatelného přežití s pacienty bez mutovaného CEBPA; tento trend se pomalu mění po déle jak pěti letech (obr.23). Pokud pacienti nemají mutované FLT3, je pozitivní vliv mutací CEBPA ještě markantnější (obr.24). FLT3, který je velmi silným negativním prognostickým faktorem, pozitivní účinek CEBPA ruší (obr.25).

Našli jsme 22 nových, dosud nepopsaných mutací v genu CEBPA a tři již známé mutace (68delC, 912_913insTTG, 311_313del [40,101,132,133]) (tab.14). Mutaci 68delC popsal poprvé Smith [133] u tří členů rodiny. Tato mutace způsobuje ztrátu jednoho cytosinového zbytku mající za následek posun čtecího rámce na N-konci (stop kodón mezi TAD1 a TAD2) a tím zkrácení 42kDa formy C/EBP α a nadprodukcí 30kDa isoformy, která postrádá první transaktivační doménu (TAD1), ale zachovává si TAD2, DBD (DNA binding domain) a ZIP oblasti. V důsledku toho CEBPA ztrácí svou funkci, což je spojováno s latentním průběhem onemocnění (10 až 30 let) a pozdějším propuknutím AML.

Mutace CEBPA byly nalezeny u pacientů s AML s frekvencí přibližně 5-14% a všechny byly heterozygotní. N-koncová mutace bez posunu čtecího rámce 311_313del dává vzniknout proteinu velmi podobnému 30kDa isoformě C/EBP α . Mutace CEBPA na N-konci s posunem čtecího rámce (uvedené v tab.14 u pacientů 11710, 15523, 15671) jsou spojovány se vznikem zkrácené formy C/EBP α a ztrátou jeho funkce. Na druhou stranu, tento zkrácený protein nemůže dimerizovat s 42kDa C/EBP α a inhibuje jeho funkci.

Některé mutace na C-konci C/EBP α způsobují ztrátu původního stop kodónu a tím posun translační oblasti (mutace u 11460, 14849, 15613 v tab.14). Výsledkem je větší protein, který obsahuje všechny funkční domény, ale jeho schopnost dimerizovat může být pozměněna nebo úplně chybět.

Uvedené delece jsme nenalezli jenom u pacientů s MDS a AML, ale také u pacientů například s CML a ischemickým onemocněním. Tyto mutace měly obvykle společné tyto znaky: 1. ohraničení dvou- nebo vícenukleotidovými repeticemi, 2. obvykle zachovaný čtecí rámec, ale ne vždy, 3. ztráta jedné z repeticí delecí. Frekvence výskytu delecí závisí na velikosti hraničních repeticí. Asi nejčastější repeticí je 508_906del. Ohraničena je desetinukleotidovou repeticí GCCAAGCAGC (508-517_907-916). Delece tohoto typu se vyskytují jen u malého procenta buněk a proto jsou jen těžko detekovatelné. Nejlépe se detekují v cDNA, protože mají narušenou autoregulaci transkripce a tvoří tedy vyšší procento RNA, než by odpovídalo jejich četnosti na úrovni buněk. Častý výskyt více delecí společně u jednoho pacienta

naznačuje, že mají původ v poruše některého z opravných mechanismů pravděpodobně častějším výskytu nedostatečného crossoveru.

Změny struktury C/EBP α v důsledku uvedených delecí většinou znamenají ztrátu funkce oblasti BR a leucinového zipu a tím i funkce transkripčního faktoru C/EBP α a jeho antiproliferační aktivity.

Naše výsledky potvrzují význam dalších necytogenetických metod pro získání informace o prognóze pacienta především s normálním karotypem.

ZÁVĚR

Vliv TGF β 1 na hladinu mRNA příslušných cílových genů většinou odpovídá běžnému působení tohoto cytokinu u řady typů buněk. Účinek TGF β 1 na proliferaci buněk ML2 neodpovídá inhibičnímu účinku na proliferaci buněk. Buňky ML2 jsou resistantní na antiproliferační vliv TGF β 1. Z dosažených výsledků se domníváme, že tato skutečnost je způsobena stimulací hladiny mRNA onkoproteinů.

Tato práce přináší první důkaz, že abnormálně zvýšená hladina SnoN a nedetekovatelná hladina důležitých regulátorů buněčného cyklu p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1} v buňkách ML2 může vést k resistenci proliferace buněk na inhibiční účinek TGF β 1. Látky, které jsou schopny obnovit normální hladinu těchto proteinů, mohou zastavit resistenci proliferace buněk na inhibiční účinek TGF β 1 a mohly by být v budoucnu využity jako chemoterapeutika.

Otázku, zda je třeba u pacienta s AML a normálním karyotypem při detekované nepřítomnosti negativních prognostických faktorů (zvýšené exprese genů *ERG*, *EVII*) podstoupit transplantaci kostní dřeně, je nutno řešit komplexně. Samozřejmě je nutné posoudit i další negativní prognostické faktory jako jsou mutace *MLL*, *FLT3-ITD*, exprese *BAALC* a samozřejmě i stáří pacienta. Při nepřítomnosti nepříznivých prognostických faktorů, zejména mutací tyrosinové kinázy FLT3, se zvláště v případech přítomnosti mutace v *NPM1* dnes ve světě k transplantaci nepřistupuje.

Zhodnocením všech uvedených prognostických faktorů, ať už negativních jako jsou *ERG*, *EVII*, *FLT3*, či pozitivních jako mutace v *CEBPA*, lze získat komplexní obraz, který by měl přispět k efektivnější léčbě nemocných s AML a MDS.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Haferlach T, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 2007,14:90-97
2. Avivi I, Rowe JM. Prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2004,12:62-67
3. Marcucci G, Mrózek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol* 2004,12:68-75
4. Bienz M, Ludwig M, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005,11:1416-1424
5. Baldus CD, Mrózek K, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Brit J Haematol* 2007,137:387-400
6. Nimer SD. Is it important to decipher the heterogeneity of "normal karyotype AML"? *Best Pract Res Clin Haematol* 2008,21:43-52
7. Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al.- *Leukemia* 2008,22:915-931
8. Lowenberg B. Diagnosis and prognosis in acute myeloid leukemia--the art of distinction. *N Engl J Med* 2008,358:1960-1962
9. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al: Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008,358:1909-1918
10. Zheng R, Friedman AD, Levis M, Li L, Weir EG, Small D. Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBPalpha expression. *Blood* 2004,103:1883-1890
11. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Whitman SP, Kolitz JE, Edwards CG, Vardiman JW, Powell BL, Baer MR, Moore JO, Perrotti D, Caligiuri MA, Carroll AJ, Larson RA, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Overexpression of the ETS- related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2005,23:9234-9242
12. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, Mrózek K, Baldus CD, Carroll AJ, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B Study. High expression levels of the ETS-related

- gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2007,25:3337-3343
13. Mrózek K, Döhner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2007,14:106-114
 14. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Döhner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Ganser A. High meningeoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006,108:3898-3905
 15. Russell M, List A, Greenberg P, Woodward S, Glinsmann B, Parganas E, Ihle J, Taetle R. Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood* 1994,84:1243-1248
 16. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WLJ, Valk PJM. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003,101:837-845
 17. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, Beverloo HB, Löwenberg B, Delwel R. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008,111:4329-4337
 18. Haas K, Kundi M, Sperr WR, Esterbauer H, Ludwig WD, Ratei R, Koller E, Gruener H, Sauerland C, Fonatsch C, Valent P, Wieser R. Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variants of the oncogene EVI1 in 266 patients with de novo AML: EVI1 and MDS1/EVI1 overexpression both predict short remission duration. *Genes Chromosomes Cancer* 2008,47:288-298
 19. <http://www.diagnoza-mds.cz>
 20. www.linkos.cz/pacienti/mds_clanek.php Červinek L, MDS, 2009
 21. Bennett JM. Myelodysplastický syndrom: Příručka pro pacienty. Vydala nadace Myelodysplastic Syndromes Foundation, Inc. Šesté vydání, 2009
 22. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes – coping with ineffective hematopoiesis. *N Eng J Med* 2005,352:536–538
 23. Galton DAG. The myelodysplastic syndromes – What are they? Classification. *Scand J Haematol* 1986,45:11–20
 24. Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndromes: a perspective and review highlighting current controversies. *Leukemia Research* 2003,27:95–120

25. Neuwirtová R. Myelodysplastický syndrom: onkohematologické onemocnění vyššího vku Čes Ger Rev 2005,3(2):21-28
26. Raza A, Gregory SA, Preisler HD. The myelodysplastic syndromes in 1996: Complex stem cell disorders confounded by dual actions of cytokines. Leuk Res 1996;20:881-90.
27. Valespi T, Imbert M, Meccuci C et al. Diagnosis, classification and cytogenetics of myelodysplastic syndromes (review). Haematologica 1998,83:258-275
28. Březinová J, Zemanová Z, Čermák J, Michalova K. Fluorescence in situ hybridization confirmation of 5q deletion in patients with hematological malignancies. Cancer Genet Cytogenet 2000,117:45-49
29. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 1982,51:189-199
30. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD.. WHO classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. J Clin Oncol 1999,17:3835-3849
31. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey FR, Berg DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. Cancer Res 1998,58(18):4173-4179
32. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. Blood 2000,96(13):4075-4083
33. Bryan L. Betz, L. Hess. Acute Myeloid Leukemia Diagnosis in the 21st Century. Arch Pathol Lab Med. 2010,134:1427-1433
34. Fröhling S, Schlenk RF, Breittruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML Study Group Ulm. Blood 2002,100:4372-4380
35. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: Association with

FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002,99:4326-4335

36. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005,352:254-266
37. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood* 2005,106:3740-3746
38. Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005,106:3733-3739
39. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002,100:2717-2723
40. Fröhling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004,22:624-633
41. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 2003,102:1613-1618
42. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, et al. High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2006,24:1507-1515
43. Papajík T, Faber E, Ondrák K. Nové směry a perspektivy v léčbě hematologických malignit. *Int med pro praxi* 2003,2:71-77
44. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003,113:685-700
45. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005,21:659-93
46. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000,97:2626-31

47. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P.
Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β receptors.
EMBO J 2002,21:1743-53
48. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β
family signalling. Nature 2003,425:577-84
49. Chen C-R, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking
the TGF β receptor to c-myc repression. Cell 2002,110:19-32
50. Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL. TGF- β -induced
RhoA and p160^{ROCK} activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant
cell-cycle arrest. Proc Natl Acad Sci USA 2003,100:15548-53
51. Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce
p15^{Ink4B} transcription in response to TGF-beta. EMBO J 2000,19:5178-93
52. Pardali K, Kurisaki A, Morén A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakas A. Role of Smad
proteins and transcription factor Sp1 in p21^{WAF1/Cip1} regulation by transforming growth
factor- β . J Biol Chem 2000,275:29244-56
53. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic
role in the regulation of hematopoiesis. Blood 2000,96:2022-36
54. Derynck R, Akhurst J, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer
progression. Nat Genet 2001,29:117-29
55. Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on
tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev 2002,12:22-9
56. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in
carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 2003,100:8621-23
57. Bachman KE, Park BH. Dual nature of TGF- β signaling: tumor suppressor vs. tumor
promoter. Curr Opin Oncol 2004,17: 49-54
58. Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor- β signaling in normal and malignant
hematopoiesis. Leukemia 2003,17:1731-7
59. Lin H-K, Bergmann S, Pandolfi PP. Deregulated TGF- β signaling in leukemogenesis.
Oncogene 2005,24:5693-700
60. Larsson J, Blank U, Helgadottir H, Bjornsson JM, Ehinger M, Goumans MJ et al. TGF-
 β signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and
regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. Blood
2003,102:3129-35

61. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J* 1999,18:1280-91
62. Jakubowiak A, Pouponnot C, Berguido F, Frank R, Mao S, Massague J et al. Inhibition of the transforming growth factor- β 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. *J Biol Chem* 2000,275:40282-7
63. Kurokawa M, Mitani K, Imai Y, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H. The t (3;21) fusion product AML1/Evi1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor- β -mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 1998,92:4003-12
64. Sood R, Talwar-Trikha A, Chakrabarti SR, Nucifora G. MDS1/Evi1 enhances TGF- β 1 signaling and strengthens its growth inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/Evi1, product of the (3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF- β 1. *Leukemia* 1999,13:348-57
65. Fuchs O. EVI1 a jeho úloha u myelodysplastických syndromů, myeloidní leukémie a dalších maligních onemocnění. *Čas Lék Čes* 2006,145:619-624
66. Mucenski ML, Taylor BA, Copeland NG, Jenkins NA. Chromosomal location of Evi-1, a common site of ecotropic viral integration in AKXD murine myeloid tumors. *Oncogene Res* 1988,2:219-23
67. Buonamici S, Chakraborty S, Senyuk V, Nucifora G. The role of EVI1 in normal and leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 2003,31:206-212
68. Zoccola D, Legros L, Cassuto P, Fuzibet JG, Nucifora G, Raynaud SD. A discriminating screening is necessary to ascertain EVI1 expression by RT-PCR in malignant cells from the myeloid lineage without 3q26 rearrangement *Leukemia*, 2003,17: 643- 645
69. Haas K, Kundi M, Sperr WR, Esterbauer H, Ludwig WD, Ratei R, Koller E, Gruener H, Sauerland C, Fonatsch C, Valent P, Wieser R. Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variants of the oncogene EVI1 in 266 patients with de novo AML: EVI1 and MDS1/EVI1 overexpression both predict short remission duration. *Genes Chromosomes Cancer* 2008,47:288-298
70. Yatsula B, Lin S, Read AJ, Poholek A, Yates K, Yue D, Hui P, Perkins AS. Identification of binding sites of EVI1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 2005,280:30712-30722

71. Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, Takahashi T, Izutsu K, Ogawa S, Moriguchi T, Nishida E, Yazaki Y, Hirai H. The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. *EMBO J* 2000,19:2958-2968
72. Tanaka T, Nishida J, Mitani K, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H. Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J Biol Chem* 1994,269:24020-24026
73. Chakraborty S, Senyuk V, Sitailo S, Chi Y, Nucifora G. Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in co-localization in nuclear speckles. *J Biol Chem* 2001,276:44936-44943
74. Palmer S, Brouillet JP, Kilbey A, Fulton R, Walker M, Crossley M, Bartholomew C. Evi-1 transforming and repressor activities are mediated by CtBP co-repressor proteins. *J Biol Chem* 2001,276:25834-25840
75. Chi Y, Senyuk V, Chakraborty S, Nucifora G. EVI1 promotes cell proliferation by interacting with BRG1 and blocking the repression of BRG1 on E2F1 activity. *J. Biol. Chem* 2003,278:49806-49811
76. Reddy ES, Rao VN, Papas TS. The erg gene: a human gene related to the ets oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987,84:6131-6135
77. Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003,303:11-34
78. Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004,95:626-633
79. Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnun K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM. Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 2008,111:3498-3506
80. McLaughlin F, Ludbrook VJ, Cox J, von Carlowitz I, Brown S, Randi AM. Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation. *Blood* 2001,98:3332-3339
81. Baldus CD, Burmeister T, Martus P, Schwartz S, Gökbuget N, Bloomfield CD, Hoelzer D, Thiel E, Hofmann WK. High expression of the ETS transcription factor ERG predicts adverse outcome in acute T-lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol* 2006,24:4714-4720

82. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2006,66:8347-8351
83. Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Yung E, Piper J, Fung S, Schlenk RF, Dohner K, Hinrichsen T, Rudolph C, Schambach A, Baum C, Schlegelberger B, Dohner H, Ganser A, Humphries RK. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood* 2007,110:1639-1647
84. Carella C, Bonten J, Sirma S, Kranenburg TA, Terranova S, Klein-Geltink R, Shurtleff S, Downing JR, Zwarthoff EC, Liu PP, Grosveld GC. MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia* 2007,21:1679-1690
85. Grosveld GC. MN1, a novel player in human AML. *Blood Cells Mol Dis* 2007,39:336-339
86. Fuchs O. Growth-inhibiting activity of transcription factor C/EBPalpha, its role in haematopoiesis and its tumour suppressor or oncogenic properties in leukaemias. *Folia Biol (Praha)*. 2007,53:97-108
87. Leal A, Ende S, Stengel C, Huehne K, Loetterle J, Barrantes R, Winterpacht A and Rautenstrauss B. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene* 2003,312:165-171
88. Simons M, Wang M, McBride OW, Kawamoto S, Yamakawa K, Gdula D, Adelstein RS, Weir L. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* 1991,69:530–539
89. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Barker DF, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin Anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-Like Syndromes. *Am J Hum Genet* 2001,69:1033–1045
90. Maupin P, Phillips CL, Adelstein RS, Pollard TD: Differential localization of myosin/II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci* 1994,107(11):3077-3090
91. Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and Smad molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* 2000,89:251-8
92. Takahura S, Okamoto A, Saito M, Yasuhara T, Shinozaki H, Isonishi S et al. Allelic imbalance in chromosome band 18q21 and SMAD4 mutations in ovarian cancers. *Gen Chrom Cancer* 1999,24:264-71

93. Palumbo A, Minowada J, Erikson J, Croce CM, Rovera G. Lineage infidelity of human myelogenous leukemia cell line. *Blood* 1984,64:1059-1063
94. Minowada J. Immunology of leukemic cells, in Gunz F, Henderson E (eds.): *Leukemia*. Orlando, Florida, Grune & Stratton 1982, p.119-139
95. Chen P, Chiu C, Chiou T, Maeda S, Chiang H, Tzeng C, Sugiyama T, Chiang BN. *Gann* 1984,75:660-664
96. Drexler HG, Gaedicke G, Maeda S, Chen PM, Minowada J. Monocytoid leukemia cell line CTV-1: morphological, immunological and isoenzymatic characteristics. *Tumour Biol* 1986,6(5):503-517
97. Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N. Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 1991,77:2031-3036
98. Larizza L, Magnani I, Beghihi A. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2005,46:247-255
99. Dybedal I, Jacobsen SEW. Transforming growth factor β (TGF- β), a potent inhibitor of erythropoiesis: neutralizing TGF- β antibodies show erythropoietin as a potent stimulator of murine burst-forming unit erythroid colony formation in the absence of a burst-promoting activity. *Blood* 1995,86:949-57
100. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) in acute myeloid leukaemia. *Nat Genet* 2001,27:263-270
101. Liang DC, Shih LY, Huang CF, Hung IJ, Yang CP, Liu HC, Jaing TH, Wang LY, Chang WH. *CEBPA* mutations in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005,19:410-414
102. Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrózek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, Ruppert AS, Mohamed N, Davuluri RV, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A. Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004,101:3915-3920
103. Taetle R, Payne C, Dos Santos B, Russell M, Segarini P. Effects of transforming growth factor- β 1 on growth and apoptosis of human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 1993,53:3386-93

104. Drexler HG, Zaborski M, Quentmeister H. Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent human leukemia cell lines. *Leukemia* 1997,11:701-9
105. Drexler HG, Meyer C, Zaborski M, Uphoff CC, Quentmeister H. Growth-inhibitory effects of transforming growth factor- β 1 on myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* 1998,22:927-38
106. Hu X, Zuckerman KS. Cell cycle and transcriptional control of human myeloid leukemic cells by transforming growth factor beta. *Leuk Lymphoma* 2000,38:235-46
107. Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S et al. Mutations of Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis. *Oncogene* 2001,20:88-96
108. Koschmieder S, Hofmann W-K, Kunert J, Wagner S, Ballas K, Seipelt G et al. TGF β -induced SMAD2 phosphorylation predicts inhibition of thymidine incorporation in CD34⁺ cells from healthy donors but not from patients with AML. *Leukemia* 2001,15:942-9
109. Westerhausen DR, Hopkins WE, Billadello JJ. Multiple transforming growth factor-beta inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1991,266:1092-100
110. Pertovaara L, Sistonen L, Bos TJ, Vogt PK, Keski-oja S, Alitalo K. Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor β stimulation. *Mol Cell Biol* 1989,9:1255-62
111. Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto M, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor- β : expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res* 2001, 92:257-68
112. Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999,286:771-4
113. Lee J, Park B-J, Park J-H, Yang M-H, Chi C-G. TGF- β 1 inhibition of apoptosis through the transcriptional up-regulation of Bcl-X_L in human monocytic leukemia U937 cells. *Exp Mol Med* 1999,31:126-33
114. Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002,307:1-14
115. Sánchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005,16:15-34

116. Benckert C, Jonas S, Cramer T, von Marschall Z, Schäfer G, Peters M et al. Transforming growth factor β 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2003,63:1083-92
117. Wang L, Kwak JH, Kim SI, He Y, Choi ME. Transforming growth factor- β 1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase 3- $p38\alpha$ and $p38\delta$ mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells. *J Biol Chem* 2004,279:33213-19
118. Kamaraju AK, Roberts AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in TGF- β -mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 2005,280:1024-36
119. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001,12:1-8
120. Luo K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2004,14:65-70
121. Edmiston JS, Yeduell WA, Chung TD, Lebman DA. Inability of transforming growth factor- β to cause SnoN degradation leads to resistance to transforming growth factor- β -induced growth arrest in esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2005,65:4782-8
122. Poser I, Rothhammer T, Dooley S, Weiskirchen R, Bosserhoff AK. Characterization of Sno expression in malignant melanoma. *Int J Oncol* 2005,26:1411-17
123. Vázquez-Macias A, Ruiz-Mendoza AB, Fonseca-Sánchez MA, Briones-Orta MA, Macias-Silva M. Downregulation of Ski and Sno co-repressors by anisomycin. *FEBS Lett.* 2005,579:3701-6
124. Ullmannova V, Stöckbauer P, Hradcova M, Soucek J, Haskovec C. Relationship between cyclin D1 and $p21^{Waf1/Cip1}$ during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* 2003,27:1115-23
125. Le NTV, Richardson DR. Potent iron chelators increase the mRNA levels of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{CIP1/WAF1}$, but paradoxically inhibit its translation: a potential mechanism of cell cycle dysregulation. *Carcinogenesis* 2003, 24:1045-58
126. Chen X, Chi Y, Bloecher A, Aebersold R, Clurman BE, Roberts JM. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of $p21^{Cip1}$. *Mol Cell* 2004,16:839-47
127. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000,95:619-26

128. Russell M, List A, Greenberg P, Woodward S, Glinsmann B, Parganas E, Ihle J and Taetle R. Expression of *EVII* in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood* 1994,84:1243-1248
129. LugtharSt, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CAJ, Valk PJM, Beverloo HB, Löwenberg B and Delwel R. High *EVII* levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of *EVII* overexpression and chromozóme 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008,111:4329-4337
130. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009,113:3088–3091
131. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer* 2009,100:1343–1346
132. Barjesteh vanWaalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Meijeret J et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate risk AML. *Hematol J* 2003,4:31–40
133. Smith ML, Cavenagh JD, Lister TA, Fitzgibbon J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2005,35:12403–2407

PŘÍLOHY

Publikace související s prací

Protein promyelocytární leukémie a porucha signální dráhy transformačního růstového faktoru-beta u akutní promyelocytární leukémie. Fuchs O., Provazníková D., Pešlová G. Časopis lékařů českých 2005,144(2):90-94

ČASOPIS LÉKARŮ ČESKÝCH, 144, 2005, č. 2

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Protein promyelocytární leukémie a porucha signální dráhy transformačního růstového faktoru-beta u akutní promyelocytární leukémie

Fuchs O., Provazníková D., Pešlová G.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

SOUHRN

Translokace chromozómů jsou prokázány u 50–70 % případů lidské leukémie. Gen kódující protein PML (promyelocytární leukémie) se účastní přestavby chromozómů t(15;17) u akutní promyelocytární leukémie (APL). Gen PML kóduje protein, který se koncentruje v PML-jaderných tělískách. Histoneacetyltransferázy a histondeacetylázy, proteiny modifikující chromatin, se také hromadí v těchto nukleárních tělískách v komplexech s proteinem PML a svědčí o úloze těchto komplexů v regulaci transkripce. Prokázané interakce proteinu PML s transkripčními faktory, koaktivátory a korepresory transkripce odpovídají účasti PML v regulaci transkripce. PML hraje důležitou úlohu v apoptóze, proliferaci a stárnutí buněk. Gen pro PML je genem potlačujícím vznik nádorů (tumour suppressor gene) a produkt jeho exprese ovlivňuje v negativním smyslu buněčné množení. Všechny tyto aktivity proteinu PML jsou připisovány jeho funkcím v jádře buněk. Cytoplazmatická forma PML (cPML) je také velmi důležitá a má významnou roli v přenosu signálu transformačního růstového faktoru-β (TGF-β). Cytoplazmatický PML reaguje s dvěma receptory pro TGF-β (TβRI a TβRII) na povrchu buňky a tvoří můstek mezi proteinem SARA (Smad anchor of receptor activation) a proteiny Smad a je důležitý pro dopravu celého komplexu do raných endozómů v přenosu signálu TGF-β. Ztráta funkčního cPML vede nejen k APL, ale přispívá obecně k rezistenci buněk na TGF-β a vzniku nádorů.

KLíčová slova: akutní promyelocytární leukémie, protein promyelocytární leukémie, protein SARA, proteiny Smad, transformační růstový faktor-beta.

SUMMARY

Fuchs O., Provazníková D., Pešlová G.: Promyelocytic Leukaemia Protein and Deffect of Transforming Growth Factor-beta Signalling in Acute Promyelocytic Leukaemia

Chromosome translocations are detected in 50-70 % of human leukaemia. The promyelocytic leukaemia (PML) gene is involved in the t(15;17) chromosomal translocation of acute promyelocytic leukaemia (APL). PML gene encodes a protein, which was shown to be concentrated in PML-nuclear bodies. Histone acetyltransferases and deacetylases, and chromatin-modifying proteins are accumulated in complexes with PML protein in these nuclear bodies giving the evidence of their role in transcription regulation. Physical interactions of PML protein with transcription factors, co-activators and co-repressors of transcription correspond with the role of PML in transcription regulation. PML plays an important role in apoptosis, proliferation and senescence of cells. PML gene is a tumour-suppressor gene and a product of its expression acts as a potent cell growth suppressor. All these activities of PML protein are ascribed to its nuclear functions. Cytoplasmic form of PML (cPML) is also very important and it is critical for transforming growth factor-β (TGF-β) signalling. Cytoplasmic PML interacts with two TGF-β receptors (TβRI and TβRII) and acts as a bridging factor between protein called Smad anchor of receptor activation (SARA) and Smad proteins and it plays a role in the transport of whole complex into the early endosomes in TGF-β signalling. The loss of functional cPML induces not only APL but it might influence behaviour of cancer cells and their resistance to TGF-β.

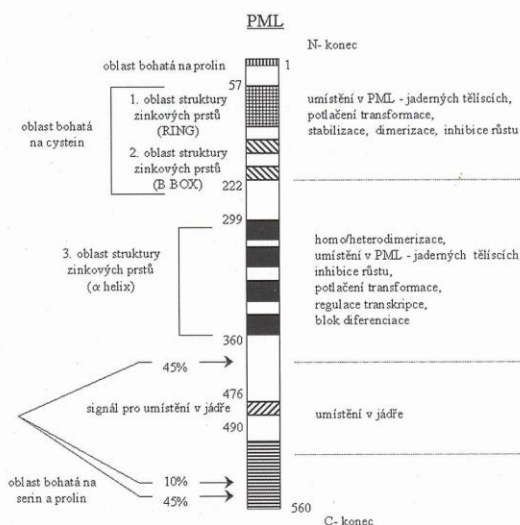
Key words: acute promyelocytic leukaemia, promyelocytic leukaemia protein, SARA protein, Smad proteins, transforming growth factor-beta.

Fu.

Cas. Lék. čes., 2005, 144, pp. 90-94.

Protein promyelocytární leukémie (PML), původně označovaný zkratkou MYL, byl nalezen (1–3) v souvislosti s přestavbou chromozómů t(15;17) u 98 % případů akutní promyelocytární leukémie (APL). Přestavba se týká genu PML na chromozómu 15 a genu pro α-receptor pro kyselinu retinovou (RARα) na chromozómu 17. Výsledkem přestavby je exprese dvou fúzních proteinů PML-RARα a RARα-PML. Fúzní protein PML-RARα má schopnost vytvořit heterodimer s proteinem PML, a tím blokovat důležité biologické funkce tohoto produktu exprese proto-onkogeny PML (4).

Protein PML se podílí na regulaci transkripce, proliferace buněk, stárnutí buněk a programované buněčné smrti (4). Všechny tyto funkce jsou připisovány jaderné formě proteinu PML. Nedávno však byla popsána také důležitá funkce pro cytoplazmatickou formu proteinu PML (5, 6) v přenosu signálu transformačního růstového faktoru-β (TGF-β). Nové výsledky ukázaly, že nejen u APL, kde je přestavbou chromozómů t(15;17) porušena funkce jaderné i cytoplazmatické formy proteinu PML, ale také u řady karcinomů, dochází ke značné snížené expresi proteinu PML (7, 8). Cytoplazmatická forma proteinu PML má



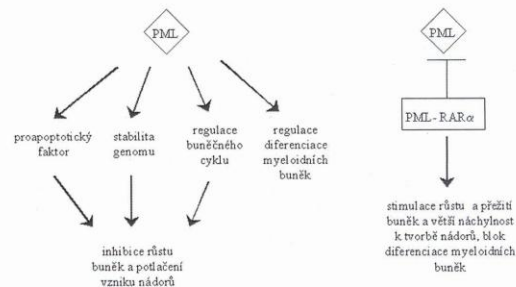
Obr. 1. Struktura proteinu PML a funkce jeho jednotlivých oblastí. Číslo udává polohu odpovídajících aminokyselinových zbytků a jsou také šipkami ukázány možné polohy míst zlomu při tvorbě fúzního proteinu PML-RAR α .

proto zřejmě také aktivitu potlačující vznik nádorů podobně jako jaderná forma tohoto proteinu.

V tomto přehledu jsou podrobněji popsány funkce jaderné i cytoplazmatické formy proteinu PML a zejména úloha cytoplazmatické formy proteinu PML v přenosu signálu cytokinu TGF- β . Porucha přenosu signálu TGF- β způsobená blokem funkce cytoplazmatické formy proteinu PML zřejmě hraje důležitou úlohu v patogenezi APL.

STRUKTURA GENU A PROTEINU PML

Gen PML (35 kb) obsahuje 9 exonů kódujících odpovídající mediátorovou RNA (mRNA). Vzhledem k alternativnímu sestřihu vzniká sedm izoform proteinu. Nejdelší forma odpovídá polypeptidu o 560 aminokyselinových zbytcích (9). Všechny izoformy proteinu PML mají shodnou N-koncovou část, ale liší se ve střední a C-koncové části. Protein PML obsahuje řadu domén (obr. 1), které dohromady tvoří důležitý motiv RBCC (RING finger motif, B-box, coiled-coil region). Uvedený motiv zahrnuje tři oblasti struktur zinkových prstů. První z těchto oblastí mezi aminokyselinovými zbytky 57–91 je označena RING (really interesting new gene) a její úlohou je zprostředkování interakcí mezi proteiny. Druhou oblastí je B-box mezi aminokyselinovými zbytky 140–222, který indukuje změny ve struktuře peptidů, a třetí oblast mezi aminokyselinovými zbytky 299–360 má tvar šroubovice a je odpovědná za multimerizaci PML a jeho heterodimerizaci s PML-RAR α . Další významnou oblastí mezi aminokyselinovými zbytky 476 a 490 je signál pro umístění v jádře buňky. Isoformy proteinu PML, které tuto oblast postrádají se nachází výhradně v cytoplazmě buněk. Ostatní izoformy proteinu PML se vyskytují v jádře i cytoplazmě buněk (10). C-konec proteinu PML obsahuje oblast bohatou na serinové a treoninové zbytky. Alternativní sestřih mRNA pro PML způsobuje různou délku této oblasti, která může sloužit jako cílové místo fosforylace. Podrobnější funkce jednotlivých popsaných oblastí jsou ukázány na obrázku 1.



Obr. 2. Funkce proteinu PML a jejich potlačení po vzniku fúzního proteinu PML-RAR α . Fúzní protein heterodimerizuje s proteinem PML a inhibuje jeho funkce.

PML-JADERNÁ TĚLÍSKA

Buňky obsahují v jádře 10 až 30 PML-jaderných tělísek, která mají průměr 0,2 až 1 μ m. Počet i velikost těchto tělísek se však mění během buněčného cyklu (11). Původně se tato tělíska označovala též jako PML-onkogenní domény (POD) nebo nukleární domény 10 (ND10). Kromě proteinu PML byly v PML-jaderných tělískách také nalezeny transkripční faktory, koaktivátory a korepresory transkripce, onkoproteiny a ribozomální proteiny. Interakce proteinu PML s některými těmito složkami byly prokázány, například s proteinem p53, proteinem retinoblastomu (pRb), proteinem CBP (cAMP response element-binding protein) a proapoptotickým proteinem Daxx (Fas death domain-associated protein). U buněk myši s vyřazeným genem pro PML byla nalezena změna umístění těchto proteinů, protože PML je důležitý pro tvorbu a celistvost PML-jaderných tělísek (12).

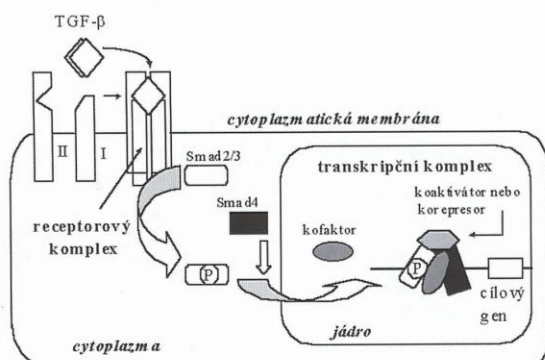
Modifikace proteinu PML sumoylací

Pro zachování struktury těchto tělísek je nezbytná modifikace proteinu PML sumoylací (13). SUMO (small ubiquitin-related modifier) proteiny modifikují celou řadu cílových proteinů a ovlivňují tak jejich interakce, umístění, aktivitu nebo stabilitu. Sumoylace hraje především úlohu v transportu proteinů mezi cytoplazmou a jádrem.

PML-jaderná tělíska se účastní regulace transkripce a pozitivně regulují stabilitu genomu a apoptózu buněk a negativně regulují buněčný cyklus. Podrobněji jsou biologické aktivity PML popsány v dalším odstavci. Při akutní promyelocytární leukémii (akutní myeloidní leukémie M3 podle francouzsko-americko-britské nomenklatury) s přestavbou chromozómů t(15;17) za vzniku fúzního proteinu PML-RAR α jsou blokovány funkce a celistvost PML-jaderných tělísek. Podobně je tomu při infekci virem (4), kdy dochází k porušení celistvosti těchto tělísek v důsledku ztráty proteinu PML.

BIOLOGICKÉ FUNKCE JADERNÉ FORMY PROTEINU PML

Řada biologických funkcí proteinu PML (obr. 2) je zprostředkována regulací exprese cílových genů na transkripční úrovni. Přímá vazba proteinu PML k DNA zatím nebyla prokázána. Protein PML ale interaguje s transkripčními faktory, koaktivátory a korepresory transkripce a tvoří složku aktivního transkripčního komplexu. Protein PML nemá aktivitu histonacetyltransferázy, ale interaguje s proteinem CBP s touto aktivitou, která rozvolňuje strukturu chromatinu, a tím podporuje transkripci (14), např. genů



Obr. 3. Schematické znázornění přenosu signálu cytokinu TGF- β

pro jaderné receptory (receptor pro glukokortikoidy a X receptor pro kyselinu retinovou).

Jednou z funkcí proapoptotického proteinu Daxx je represe transkripce (15). Protein Daxx interaguje s korepresorem transkripce N-CoR/SMRT a histonacetylázou (HDAC1) a způsobuje kondenzaci chromatinu a inhibici transkripce např. genů pro matrixmetaloproteinázu-1, antiapoptotický protein Bcl-2 a homeoprotein Pax3 (15). Protein PML interaguje s proteinem Daxx a způsobí jeho přesun do PML-jaderných tělísek, a tím inhibuje jeho funkci represora transkripce. Naopak fúzní protein PML-RAR α u APL nezpůsobí přesun proteinu Daxx do PML-jaderných tělísek a naopak podporuje represi transkripce uvedených cílových genů (15).

Izoforma IV proteinu PML reguluje aktivitu antionkogenu p53 a je schopna způsobit předčasnou stárnutí buněk (16). Transformace onkogemem Ras vede ke zvýšené expresi proteinu PML, který způsobí předčasnou stárnutí buněk aktivací proteinu p53. Jedním ze způsobů aktivace proteinu p53 je jeho acetylace na lyzinovém zbytku 382, která vede k tvorbě stabilního transkripčního komplexu p53-PML-CBP v jaderných PML-tělíscích (17). Protein PML účinkuje jako transkripční koaktivátor proteinu p53 také při poškození DNA, např. γ -zářením. Dochází přitom k indukci cílových genů proteinu p53, kterými jsou proapoptotický protein Bax a inhibitor buněčného cyklu, protein p21CIP1. Všechny tyto pochody jsou inhibovány při ozáření myši s vyřazeným genem PML (18). Protein PML působí jako stimulator funkce proteinu p53 a potlačuje tím vznik nádorů. Fosforylace serinového zbytku 46 proteinu p53 pomocí protein kinázy HIPK2, která interaguje s homeodoménou řady transkripčních faktorů, vede také ke zvýšené aktivitě proteinu p53 a k apoptóze (19).

Protein PML se podílí na potlačení transkripce genu pro pRb, který hraje úlohu v regulaci buněčného cyklu a interaguje s pRb ve větším komplexu obsahujícím histonacetylázu 1. Uvedený komplex obsahuje také korepresory transkripce (protein c-Ski a příbuzný protein SnoN – Ski-related novel protein) a adaptorové proteiny N-CoR (nuclear hormone receptor co-repressor) a mSin3 (19). Tento mechanismus také přispívá k inhibici růstu buněk a k potlačení vzniku nádorů. Všechny tyto funkce proteinu PML a celistvost PML-jaderných tělísek jsou blokovány vznikem fúzního proteinu PML-RAR α v blastech APL (obr. 2). Z uvedeného je zřejmé, že protein PML reguluje transkripci pRb z PML-jaderných tělísek (19).

U transgenických myši s fúzním proteinem PML-RAR α dochází k leukémii teprve po více než roce, a to přibližně jen u 20 % těchto myši. Pro vznik leukémie je tedy třeba více genetických poruch (20).

Rada proteinů s funkcí ovlivňující stabilitu genomu se hromadí v PML-jaderných tělíscích (16, 21). Jedná se o protein Bloomův

syndrom, RecQ DNA helikázu, nibrin/p95, MRE11 a další proteiny, podílející se nejen na stabilitě genomu, ale i na opravách poškozené DNA. PML ovlivňuje správnou funkci těchto proteinů tím, že zajišťuje jejich umístění v PML-jaderných tělíscích. Další důležitou funkcí proteinu PML v PML-jaderných tělíscích je tzv. „subjaderný imunitní systém“, který je citlivý na proteiny obsahující polyglutamin (opakování trinukleotidu CAG), ataxiny a huntingtin u neurodegenerativních chorob (22).

FUNKCE CYTOPLAZMATICKÉ FORMY PROTEINU PML

Protein PML vykazuje další funkce v cytoplazmě buněk. Při infekci virem HIV dochází k nahromadění proteinu PML v cytoplazmě infikovaných buněk. Důsledkem je snížená schopnost viru integrovat se do genomu napadené buňky (23).

Velmi důležitá cytoplazmatická úloha proteinu PML byla objevena teprve nedávno (5, 6) a týká se přenosu signálu cytokinu TGF- β . TGF- β reguluje proliferaci a diferenciaci různých typů buněk. Dále je důležitý v embryonálním vývoji a při homeostáze tkání v dospělosti, při tvorbě extracelulární matrix, v krvetvorbě, v imunitní odpovědi a zánětu, při hojení ran a v apoptóze buněk (24–28). Aktivní homodimer TGF- β se váže na receptor typu II (T β RII) na povrchu buněk (obr. 3). Tento receptor je funkční ve formě homodimeru a je konstitutivní proteinkinázou, fosforylující serinové a treoninové zbytky v sekvenci TTSGSGSG molekul receptoru typu I (T β RI). T β RI je aktivní také ve formě homodimeru a váže se do komplexu TGF- β s T β RII (obr. 3). T β RI je také označován ALK5 („activin receptor like kinase“).

Proteiny Smad2 a Smad3 jsou přímo fosforylovány pomocí T β RI v sekvenci Ser-Ser-X-Ser v C-koncové oblasti proteinů Smad. Proteiny Smad2 a Smad3 se po této aktivaci přemístí do jádra, kde fungují jako složky transkripčních komplexů a ovlivňují expresi cílových genů (obr. 3). Vazba proteinů Smad2 a Smad3 na tak zvaným společným přenašečem Smad4 byla považována za nezbytný předpoklad transportu přes jadernou membránu. Dnes je však již jasné, že Smad4 je složkou transkripčních komplexů obsahujících proteiny Smad2 nebo Smad3, ale není nezbytný pro transport přes jadernou membránu (29, 30). Smad2 i Smad3 jsou přítomny jak v cytoplazmě, tak v jádře buněk. Mechanismus defosforylace proteinů Smad2 a Smad3 je zatím nedostatečně prozkoumán.

Protein SARA slouží k ukotvení proteinů Smad2 a Smad3 prostřednictvím jejich C-koncové oblasti. Protein SARA obsahuje specifickou oblast nejen pro vazbu proteinů Smad, ale svým C-koncem se váže i ke komplexu receptorů T β RI a T β RII s TGF- β (31, 32). Aktivace proteinů Smad2 a Smad3 fosforylací pomocí T β RI probíhá v raných endozómech. Endocytóza zprostředkovaná receptory poskytuje specifickou cestu do živočišných buněk. TGF- β v komplexu s receptory T β RI a T β RII na buněčném povrchu vstupuje do buňky v klatrinových váčcích. Váčky ztrácejí svůj plášť a potom fúzí s endozómy. V kyselém prostředí endozómu se proteiny Smad uvolní z komplexu s receptory pro TGF- β .

Endozómy jsou sada spojených membránových trubiček a větších váčků, které se dělí na rané endozómy těsně pod plazmatickou membránou a pozdní endozómy v blízkosti jádra buňky. Vnitřek endozomálního oddílu je udržován v kyselém stavu (pH 5–6) ATP-poháněnou H⁺-pumpou v endozomální membráně, která čerpá ionty H⁺ do endozomálního lumen z cytoplazmy. Umístění komplexu TGF- β s receptory T β RI a T β RII a proteiny Smad2 nebo Smad3 v raných endozómech je zajištěno proteinem SARA. Rané endozómy jsou charakterizovány přítomností raného endozomálního antigenu 1 (EEA1). Jedná se o protein důležitý pro fúzi raných endocytických váčků a pro přemístění proteinů Smad2 a Smad3. Protein EEA1 obsahuje oblast nezbytnou pro

vazbu fosfatidylinositol-3-fosfátu. Aktivita fosfatidylinositol-3-kinázy a Rab5 GTPázy (33) reguluje asociaci proteinu EEA1 s endozómy a jeho účast na následných fúzí endozomálních váčků.

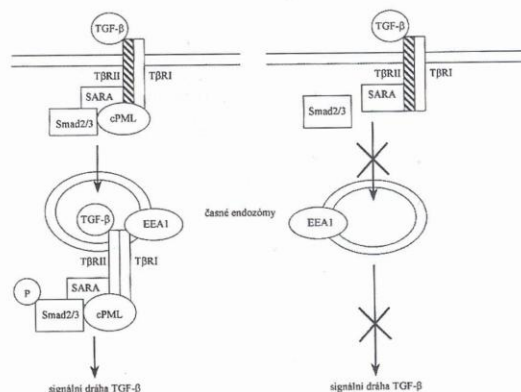
Oblast FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1) zinkových prstů i oblast, které interagují s aktivovaným proteinem Rab5 a kalmodulinem, jsou umístěny na C-konci proteinu EEA1. Protein Rab je dalším charakteristickým znakem raných endozómů. Další vazebná oblast pro protein Rab5 se nachází také na N-konci proteinu EEA1 (34). Protein SARA obsahuje také oblast FYVE, která váže fosfatidylinositol-3-fosfát (31, 32). Rané endozómy obsahují zvýšenou koncentraci fosfatidylinositolu-3-fosfátu, a to předurčuje umístění proteinů s oblastí FYVE v těchto endozómech. Liu et al. (6) použili protilátky proti EEA1 a Rab5 k izolaci raných endozómů a k průkazu nezbytné přítomnosti cytoplazmatické formy proteinu PML v komplexu proteinu SARA s receptory TβRI a TβRII, TGF-β a proteiny Smad2 nebo Smad3 (obr.4). Přítomnost jednotlivých složek v uvedeném komplexu byla prokázána imunoprecipitací pomocí protilátek proti jednotlivým složkám komplexu. Na modelu myších embryonálních fibroblastů s vyřazeným genem pro PML homologní rekombinací potom ukázali, že fosforylace proteinů Smad2 a Smad3 pomocí TβRI a transport signálu TGF-β je blokovan nepřítomností cytoplazmatické formy proteinu PML v uvedeném komplexu (obr. 4).

Blasty APL s fúzním proteinem PML-RARα v jaderné i cytoplazmatické frakci neodpovídají na signál TGF-β. Je to způsobeno heterodimerizací proteinu PML prostřednictvím jeho oblasti s motivem RBCC s fúzním proteinem PML-RARα. Fúzní protein inaktivuje protein PML a blokuje tím jeho úlohu v přenosu signálu TGF-β.

Množství funkčního PML může být u blastů APL dále sníženo mutacemi druhé alely nesoucí gen PML. Zatímco jedna alela se účastní přestavby chromozómů t(15;17), mutace genu PML druhé alely mají za výsledek tvorbu zkráceného a nefunkčního proteinu PML (35). V těchto případech APL je velmi špatná prognóza vzhledem k rezistenci na obvyklou léčbu kyselinou trans-retinovou, která je činidlem indukujícím diferenciaci leukemických buněk na zralé granulocyty (36, 37). Kromě kyseliny trans-retinové se k léčbě APL používá As₂O₃, který působí jako induktor apoptózy a diferenciace leukemických buněk (37, 38). Obě tyto látky byly schopny potlačit rezistenci buněk linie NB4 (blastů APL s fúzním proteinem PML-RARα) k TGF-β, a to degradací fúzního proteinu a obnovením fosforylace Smad2 a Smad3 a jejich přemístění do jádra, kde regulují transkripci cílových genů (6).

PORUCHA FUNKCE PML U KARCINOMŮ

Porucha funkce proteinu PML byla pozorována nejen u blastů APL, ale i u řady karcinómů (7, 8). U karcinómů není způsobena vznikem fúzního proteinu ani expresí genu PML na úrovni transkripce, ale pravděpodobně nestabilitou proteinu PML. Ve srovnání se zdravými kontrolními tkáněmi nejsou hladiny mRNA pro PML pozměněny, ale hladiny proteinu PML jsou významně sníženy. Hladina proteinu PML zřejmě hraje regulační úlohu při vzniku nádorů plic, prostaty, mléčné žlázy a centrální nervové soustavy (7, 8, 39). Je třeba zjistit, zda obnovení exprese PML na úrovni proteinu potlačí růst nádoru. Dalším úkolem je objasnit, jaký post-transkripční mechanismus je zodpovědný za pokles hladiny proteinu PML. Pokud by byl rozklad PML způsoben proteazómou, nabízí se jako řešení použití klinicky odzkoušených inhibitorů proteazómů, např. bortezomibu (39, 40). Zatím používané inhibitory proteazómů nejsou však specifické pro protein PML a chybí experimentální důkaz pro specifické zvýšení hladiny PML po použití inhibitorů proteazómů v buňkách karcinómů (39).



Obr. 4. Schematické znázornění úlohy cytoplazmatické formy PML (cPML) v komplexu s proteiny TβRI, TβRII, TGF-β, SARA a Smad2 nebo Smad3 v umístění tohoto komplexu do raných endozómů, které je předpokladem pro následující fosforylaci proteinů Smad pomocí TβRI a pro transport do jádra, kde regulují transkripci cílových genů

Jsou porovnány dva případy, a to myši embryonální fibroblasty-divoký typ a typ s vyřazeným genem pro PML homologní rekombinací. Při vyřazení genu PML dochází k inhibici signální dráhy TGF-β.

ZÁVĚR

Jaderná forma proteinu PML se podílí na důležitých buněčných funkcích jako je proliferace, transkripce a apoptóza. PML je důležitý nádorový supresor. Nově objevená funkce cytoplazmatické formy proteinu PML v přenosu signálu TGF-β potom spojuje funkci tohoto dalšího supresoru nádorů s funkcí PML. Léčba APL je dnes velmi úspěšná. Je založena na rozkladu fúzního proteinu a obnovení funkce proteinu PML. Podobně se zdá, že i u řady nádorů bude důležité nalezení podmínek pro obnovu funkce PML.

Zkratky

AML	– akutní myeloidní leukémie
APL	– akutní promyelocytární leukémie
protein CBP	– cAMP response element-binding protein
EEA1	– raný endozomální antigen 1
Fab1p	– fosfatidylinositol-3-fosfát-kináza
FYVE	– Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1, oblast pojmenovaná podle prvních čtyř izolovaných proteinů, které ji obsahují
HDAC1	– histondeacetyláza
HIPK2	– proteinkináza 2, která interaguje s homeodoménou
ND10	– nukleární domény 10
PML	– promyelocytární leukémie
POD	– PML-onkogenní domény
pRb	– protein retinoblastomu
RAR	– receptor pro kyselinu retinovou
RNA	– kyselina ribonukleová
RBCC	– RING finger motif, B-box, coiled-coil region
RING	– really interesting new gene
protein SARA	– kotva pro proteiny Smad a receptory pro TGF-β
Ser	– serin
Smad	– proteiny zahrnuté v přenosu signálu TGF-β u savců
	Označení vzniklo spojením názvů příbuzných genů nejprve objevených u <i>C. elegans</i> a <i>D. melanogaster</i> (Sma- small body size u <i>C. elegans</i> a Mad – mothers against decapentaplegic u drosofilů).
SnoN	– Ski-related novel protein
SUMO	– small ubiquitin-related modifier

TβR	– receptor pro transformační růstový faktor β
TGF-β	– transformační růstový faktor β
Vac1p	– protein kvasinek nezbytný pro vezikulární transport a třídění proteinů
YOTB	– protein izolovaný z <i>Caenorhabditis elegans</i> a obsahující oblast FYVE

LITERATURA

1. de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M. et al.: The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature*, 1990, 347, s. 558-561.
2. Pandolfi, P. P., Grignani, F., Alcalay, M. et al.: Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene*, 1991, 6, s. 1285-1292.
3. Kakizuka, A., Miller, W. H. Jr., Umesono, K. et al.: Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, 1991, 66, s. 663-674.
4. Ruggero, D., Wang, Z.-G., Pandolfi, P. P.: The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *BioEssays*, 2000, 22, s. 827-835.
5. Le Roy, C., Wrana, J. L.: An unexpected social servant. *Nature*, 2004, 431, s. 142.
6. Lin, H.-K., Bergmann, S., Pandolfi, P. P.: Cytoplasmic PML function in TGF- β signalling. *Nature*, 2004, 431, s. 205-211.
7. Zhang, P., Chin, W., Chow, L.T. et al.: Lack of expression for the suppressor PML in human small cell lung carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2000, 85, s. 599-605.
8. Gurrieri, C., Capodice, P., Bernardi, R. et al.: Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004, 96, s. 269-279.
9. Melnick, A., Licht, J. D.: Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1999, 93, s. 3167-3215.
10. Flenghi, L., Fagioli, M., Tomassoni, L. et al.: Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood*, 1995, 85, s. 1871-1880.
11. Terris, B., Baldin, V., Dubois, S. et al.: PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.*, 1995, 55, s. 1590-1597.
12. Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev D. et al.: PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell. Biol.*, 1999, 147, s. 221-234.
13. Zhong, S., Muller, S., Freemont, M. S. et al.: Role of SUMO-1 modified PML in nuclear body formation. *Blood*, 2000, 95, s. 2748-2752.
14. Doucas, V., Tini, M., Egan, D. A. et al.: Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, s. 2627-2632.
15. Li, H., Chen, J. D.: PML and the oncogenic nuclear domains in regulating transcriptional repression. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, 12, s. 641-644.
16. Zimmer, A., Nguyen, Q.-D., Gespach, C.: Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell. Signal.*, 2004, 16, s. 1085-1104.
17. Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C. et al.: PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, 2000, 406, s. 207-210.
18. Guo, A., Salomoni, P., Luo, J. et al.: The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, 2000, 2, s. 730-736.
19. Salomoni, P., Pandolfi, P. P.: The role of PML in tumor suppression. *Cell*, 2002, 108, s. 165-170.
20. Rego, E., Wang, Z.-G., Peruzzi, D. et al.: Role of promyelocytic leukemia (PML) protein in tumor suppression. *J. Exp. Med.*, 2001, 23, s. 521-529.
21. Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z. et al.: A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene*, 1999, 18, s. 7941-7947.
22. Borden, K. L.: Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, s. 5259-5269.
23. Turelli, P., Doucas, V., Craig, E. et al.: Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol. Cell*, 2001, 7, s. 1245-1254.
24. Piek, E., Roberts, A. B.: Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signaling pathways in tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.*, 2001, 83, s. 1-54.
25. Fuchs, O., Kubrová, O.: Signální dráha indukovaná cytokiny rodiny transformačního růstového faktoru beta (TGFβ). *Biol. listy*, 2002, 67, s. 1-39.
26. Fuchs, O.: Úloha signální dráhy indukované transformačním růstovým faktorem beta při vzniku nádorů. *Klin. Onkol.*, 2002, 15, s. 7-16.
27. Miyazono, K., Suzuki, H., Imamura, T.: Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.*, 2003, 94, s. 230-234.
28. ten Dijke, P., Hill, C. S.: New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, 29, s. 265-273.
29. Shi, Y., Massague, J.: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113, s. 685-700.
30. Fahrenkrog, B., Acti, U.: The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, 4, s. 757-766.
31. Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. E. et al.: SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFβ receptor. *Cell*, 1998, 95, s. 779-791.
32. Itoh, F., Divecha, N., Brocks, L. et al.: The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-β/Smad signalling. *Genes Cells*, 2002, 7, s. 321-331.
33. Delprato, A., Merithew, E., Lambright, D. G.: Structure, exchange determinants, and family-wide Rab specificity of the tandem helical bundle and Vps 9 domains of Rabex-5. *Cell*, 2004, 118, s. 607-617.
34. Lawe, D. C., Sitouah, N., Hayes, S. et al.: Essential role of Ca²⁺/calmodulin in early endosome antigen-1 localization. *Mol. Biol. Cell*, 2003, 14, s. 2935-2945.
35. Gurrieri, C., Nafa, K., Merghoub, T. et al.: Mutations of the PML tumor suppressor gene in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 2004, 103, s. 2358-2362.
36. Huang, M., Yu-Chen, Y., Shu-Rong, C. et al.: Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1988, 72, s. 567-572.
37. Tallman, M. S., Nabhan, C., Feusner, J. H. et al.: Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood*, 2002, 99, s. 759-767.
38. Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F. F. et al.: Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90, s. 124-133.
39. Dmitrovsky, E.: Tissue microarrays for hypothesis generation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004, 96, s. 248-249.
40. Voorhees, P. M., Dees, E. C., O'Neil, B. et al.: The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, s. 6316-6325.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NC/7605-3.

ing. Ota Fuchs, CSc.
Ústav hematologie a krevní transfuze
128 20 Praha 2, U Nemocnice 1
fax: 221 977 370
e-mail: ota.fuchs@uhkt.cz

The Increased Expression of SnoN and Undetectable Levels of Important Cell Cycle Regulators, Proteins p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} as Probable Causes of the Resistance of ML-2 Cells Proliferation to Transforming Growth Factor- β 1. Provazníková D., Pešlová G., Marinov I., Babusiak M., Vyoral D., Fuchs O. New Research on Signal Transduction, Nova publishers, 2007, Chapter 9, 189-209

In: New Research on Signal Transduction
Editor: Bruce R. Yanson, pp. 189-209

ISBN 1-60021-379-0
© 2007 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 9

**THE INCREASED EXPRESSION OF SNO^N AND
UNDETECTABLE LEVELS OF IMPORTANT
CELL CYCLE REGULATORS, PROTEINS p21^{WAF1/CIP1}
AND p27^{KIP1} AS PROBABLE CAUSES OF
THE RESISTANCE OF ML-2 CELLS PROLIFERATION
TO TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1**

***Dana Provaznikova^a, Gabriela Peslova^a, Iuri Marinov^a, Marek
Babusiak^a, Daniel Vyoral^{a,b}, Ota Fuchs^{a*}***

^aInstitute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

^bInstitute of Pathophysiology, First Medical Faculty,
Charles University, Prague, Czech Republic

ABSTRACT

The loss of a growth inhibitory response to TGF- β 1 is a common feature of many cancers. However, the role of the disruption of TGF- β 1 signalling in the development of leukemia or in the progression of this disease is not yet well understood. Here, we found that human myeloblastic ML-2 cells are resistant to TGF- β 1-induced growth arrest. Our further results suggest that disruption of TGF- β 1 signalling is not caused by mutational inactivation of TGF- β 1 signalling components (TGF- β 1 receptors and Smad proteins). However, we detected the inappropriately increased expression of the transcriptional co-repressor SnoN (Ski-related novel gene product), one of the inhibitors of TGF- β 1 signalling pathway, after the treatment of ML-2 cells with TGF- β 1. At the same time, TGF- β 1 treated cells displayed undetectable levels of p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} proteins, which play a key role in the cell cycle regulation. This elevation of SnoN levels and

* Corresponding author. Fax: +420 221977370. E-mail address: Ota.Fuchs@uhkt.cz (O.Fuchs).

undetectable levels of p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} are the likely cause of ML-2 cells proliferation resistance to TGF- β 1. TGF- β 1 signalling is also dependent on other signalling pathways (for example mitogen-activated protein kinases /MAPK/ and phosphatidylinositol-3-kinase /PI3K/ pathways) and on some cellular events (for example histone deacetylation and proteolytic degradation in proteasomes). Thus, the second aim was to study the effect of MAPK, PI3K, histone deacetylases (HDACs) inhibitors (HDAIs) and proteasome inhibitors on TGF- β 1 signalling in ML-2 cells. Agents that can activate TGF- β 1 signalling or modulate the resistance of leukemic cells to this cytokine can be used in future in therapeutic strategies for treatment of leukemia.

Keywords: AML, SnoN, Smad, TGF- β 1, TGF- β 1 receptors

INTRODUCTION

Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) is a multifunctional cytokine involved in a variety of biological processes including development, cell growth, differentiation, apoptosis, cell adhesion, migration, extracellular matrix deposition, angiogenesis and immune response. TGF- β 1 signals through transmembrane serine/threonine kinase receptors and activation of the receptor-regulated Smad proteins (R-Smads). R-Smads form heteromeric complexes with the common partner Smad4 and translocate to the nucleus. Nuclear Smad complexes regulate the expression of many different genes (for example TGF- β 1 receptor II / T β RII/, Smad7, plasminogen activator inhibitor-1 /PAI-1/, JunB, cyclin-dependent kinase inhibitors /p15^{Ink4B}, p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1}/, c-myc, RhoA, Cdk2-activating phosphatase /Cdc25A/, IL6, inhibitor of DNA binding/differentiation /Id1/, transferrin receptor 1 /TfR1/, alternative splicing forms of Sno /SnoA and SnoN/) by interacting with various transcription factors and transcriptional coactivators and corepressors [1,2]. In mammalian cells, there are eight different Smad proteins. Smad2 and Smad3 are activated by TGF- β and activin receptors (T β RI /ALK-5/ and ActRIB /ALK4/), whereas Smad1, Smad5 and Smad8 are activated by bone morphogenetic proteins (BMPs). In some cases (endothelial and hematopoietic cells) activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) mediates TGF- β signal through Smad1, Smad5 and Smad8 [3,4]. There are also known inhibitory Smads (Smad6 and Smad7) which decrease TGF- β superfamily signalling [1,2]. Depending on the cell line, TGF- β can also activate other signalling cascades, including mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, Rho-like GTPases, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and other pathways in Smad-dependent or Smad-independent way [5].

Inhibition of cell proliferation is central to the TGF- β response of epithelial, endothelial, hematopoietic, neural and certain types of mesenchymal cells. TGF- β -mediated growth arrest involves distinct mechanisms, such as downregulation of c-myc [6], Cdc25A [7] and upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p15^{Ink4B}, p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} [8-10]. Disruption of TGF- β signalling, either by mutational inactivation of signalling components or by downregulation of their expression play an important role in cancer development [11]. Several TGF- β signalling components (T β RII, T β RI, Smad4 and Smad2) act as tumor suppressors at early stages of tumor development [11]. Apart from its role as tumor suppressor, TGF- β can also have oncogenic roles in the late stages of tumor development and metastasis [11-14].

The role of TGF- β in leukemogenesis is not well understood [15,16]. Disruption of TGF- β signalling alone is not sufficient for the development of leukemia. T β RI knockout mice and Smad3-null mice did not exhibit any signs of leukemia [16,17,18] and mutations in TGF- β signalling components are rare in hematopoietic tumors [15,16]. However, TGF- β signalling can be blocked by interaction of R-Smad proteins with mutated proteins. As an example, fusion proteins AML1/ETO, AML1/EVI1 and AML1/MDS1/EVI1 created in myeloid leukemia by chromosomal translocations t (8;21) and t (3;21) associate with Smad3 and repress its activity in TGF- β signalling [19-21]. Oncoproteins Evi-1, E1A, Tax, Ski and SnoN interact also with Smad3 thereby suppressing its transcription factor activity and TGF- β signalling [16]. The loss of TGF- β response may be a critical second step involved in the progression of leukemia.

In this work we used human myeloblastic ML-2 cells to study TGF- β 1 signalling. We found that these cells are resistant to TGF- β 1-induced growth arrest but some TGF- β 1 target genes are expressed in normal way. Our aim was to elucidate the cause of resistance of ML-2 cells to TGF- β 1-induced growth arrest. TGF- β 1 signalling is also dependent on other signalling pathways (for example MAPK and PI3K pathways) and on some cellular events (for example histone deacetylation and proteolytic degradation in proteasomes). Thus, the second aim was to study the effect of MAPK, PI3K, histone deacetylases (HDACs) inhibitors (HDAIs) and proteasome inhibitors on TGF- β 1 signalling in ML-2 cells. Agents that can activate TGF- β 1 signalling or modulate the resistance of leukemic cells to this cytokine can be used in future in therapeutic strategies for treatment of leukemia.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Recombinant human TGF- β 1 and mouse anti-human TGF- β 1 monoclonal neutralization antibody were obtained from CytoLab Ltd./PEPROTECH (Rehovot, Israel) and from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Anti-human Sno rabbit polyclonal antibody, nuclear extract from HeLa cells and secondary goat anti-rabbit antibody with conjugated horse radish peroxidase (HRP) were obtained from Upstate Ltd. (Dundee, Great Britain). Mouse monoclonal antibody against human p21^{Waf1/Cip1} (F5) and secondary bovine-anti mouse antibody with conjugated HRP were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). RNase-free DNase I and oligo (dT)₁₈ were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Vienna, Austria). Gradient polyacrylamide gels (4-20%) were purchased from Novex (Biotech a.s., Prague, Czech Republic). Agarose and PI3K inhibitor (LY294002) were from Promega (Madison, WI). Taq polymerase, PCR buffer, dNTP set and DNA markers and ladders were obtained from MBI Fermentas (Biogen s.r.o., Prague, Czech Republic). PCR oligonucleotide primers were synthesised in Generi Biotech s.r.o. (Hradec Kralove, Czech Republic). BigDyeTM terminator cycle sequencing ready reaction kit version 3.1 was from Applied Biosystems (Prague, Czech Republic). MAPK inhibitors (PD98059, UO126, SB203580), negative control for the p38 MAPK inhibition studies (the inactive structural homologue SB202474), proteasome inhibitors (I and II), MG132, lactacystin, histone deacetylase inhibitors (I, II and III) and apicidin were bought from Calbiochem (Merck s.r.o., Prague).

Specific inhibitor of ALK4,5 and 7 (SB431542), deferoxamine mesylate and sodium butyrate were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic).

Cell Culture

The human acute myelomonocytic leukemia cell line ML-2 was obtained from Dr. J. Minowada (Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan) through Dr. P.Stöckbauer and Dr. C.Haskovec (Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague). This cell line was established from the peripheral blood of a 26-year-old man with acute myeloid leukemia (AML M4) at diagnosis of AML [22]. Cells were maintained at $0.4-1.0 \times 10^6$ cells/ml in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum at 37° C, 5% CO₂ and humidified atmosphere. Cell viability was measured by eosin dye exclusion assay. The low concentration of active TGF- β 1 (15 pg/ml) is present in 100 % fetal bovine serum [23]. We used medium with 10% of fetal bovine serum which contained only 1.5 pg of active TGF- β 1. Therefore, the effect of TGF- β 1 is dependent on added TGF- β 1.

Cell Proliferation Assay Using [6-³H] Thymidine Incorporation

[6-³H] thymidine incorporation was used as a measure of DNA synthesis to estimate cell proliferation. ML-2 cells were preincubated without or with TGF- β 1 for 24 or 72 h. At this points, [6-³H] thymidine (185 kBq/ml; Nuclear Research Institute, Řež, Czech Republic) was added for the last 4 h of assay. In some experiments, [6-³H] thymidine was added at the beginning of incubation. At the time intervals, cells were collected by centrifugation and were washed three times with ice cold PBS buffer. Cells were then lysed with water and labeled DNA was precipitated with trichloroacetic acid (TCA, final concentration 10%). TCA preferentially precipitates DNA and RNA polymers over free nucleotides. Precipitate was collected on nitrocellulose membrane filters, washed with cold 10% TCA and radioactivity was counted using Beckman LS 1801 liquid scintillation counter.

RNA and DNA Isolation, RT-PCR, Real-time PCR and PCR

Total RNA was prepared from cells with RNA-BeeTM - RNA isolation reagent (TEL-TEST, Inc., Friendswood, TX) according to the manufacturer's instruction. The concentration and purity of RNA was measured by spectrophotometric determination of the A₂₆₀ / A₂₈₀ ratio. In order to obtain genomic DNA for using in PCR, cells were lysed in 10 mM Tris (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Nonidet P-40. 4 μ l of proteinase K solution (20 mg/ml, Sigma-Aldrich, Prague) was added to 200 μ l of lysate. Lysate was incubated at 37° C through the night and proteinase K was inactivated for 10 min at 90° C.

Table 1. Human primers used for RT-PCR and real-time PCR

Genbank Accession No	Gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Method	Annealing temp. (°C)	Product length . (bp)
BC023632	GAPDH	CATGGAGA AGGCTGGG GCTC	TGGACTGTGGT CATGAGTCCTT CC	RT-PCR + real-time PCR	61	225
BT007386	Smad1	CAGGAGGC AGGTAAGC AGGTGG	GTGGTAGGGA TTGATGCAGAC	RT-PCR	60	333
BC014840	Smad2	ATCCTAAC AGAACTTC CGCC	CTCAGCAAAA ACTTCCCCAC	RT-PCR	60	488 *
NM005902	Smad3	AGAAGACG GGGCAGCT GGAXC	GACATCGGXA TTCGGGGATAG	RT-PCR	60	510 *
NM005359	Smad4	GCATCGAC AGAGACAT ACAG	CAACAGTAAC AATAGGGCAG	RT-PCR	60	483 *
NM005903	Smad5	CGACAATT GAAAACAC TAGGCG	TATCTGTTTT AATGTAAGCTC	RT-PCR	60	534
AF015261	Smad7	GCCTCGGA CAGCTCAA TTCG	GTCCACGGCTG CTGCATAAAC	real-time PCR	60	283
BC042637	ALK1	CAGACCCG GTCCTCTCA	GCAGAAAGGA ATCAGGTGCT	real-time PCR	63	168
NM004612	TβRI (ALK5)	CAATTAAA AACTTCCA GGAT	GCATGAATTAT GTTCTCACT	RT-PCR	53	429
NM003242	TβRII	AGCAACTG CAGCATCA CCTC	TGATGTCTGAG AAGATGTCC	RT-PCR	58	687 *
X77956	Id1	GCAAGACA GCGAGCGG TG	GCTGATCTCGC CGTTGAGG	RT-PCR	58	344
BC009466	JunB	AAGGAGGA ACCGCAGA CCG	GAAGGCGTGT CCCTTGACC	RT-PCR	58	324
NM000389	p21 ^{Waf1/Cip1}	GGGATGAG TTGGGAGG AGG	GACACACAAA CTGAGACTAA GGC	real-time PCR	55	327
AF247551	p27 ^{Kip1}	ATGTCAAA CGTGCGAG TGTC	CGCTGACATCC TGGCTCTC	real-time PCR	65	331
BC018642	cdc25A	CGGTATGT GAGAGAGA GAGATCG	CAGGGACAGA AGAGGCGTAG	RT-PCR	55	449

Table 1. Human primers used for RT-PCR and real-time PCR (Continued)

Genbank Accession No	Gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Method	Annealing temp. (°C)	Product lenght . (bp)
AY500353	VEGF	ATGAACTTT CTGCTGTCTT GGG	GGTGATGTTG GACTCCTCAG TG	real-time PCR	55	309
NM001664	RhoA	AGGACCAGT TCCCAGAGG TG	GCTCCTGCTT CATCTTGGC	real-time PCR	55	333
X04744	PAI-1	TGCTGGTGA ATGCCCTCT AC	TCATGTTGCC TTCCAGTGG	real-time PCR	55	309
BC015511	IL6	GATGGCTGA AAAAGATGG ATGC	GAAGAGCCCT CAGGCTGGAC	real-time PCR	58	347
X15217	SnoA	GCATTCTCA CAGATCACC TGAC	ACTGCAAAGC ACTTTATGGC	real-time PCR	53	354
X15219	SnoN	AATGGGATG GGAGATGAT GG	TGAGGTGATG GAAGAGGCA G	real-time PCR	65	329
V00568	c-myc	GGAACGAGC TAAAACGGA GC	CTCAAGACTC AGCCAAGGTT G	real-time PCR	55	333
BC001188	TfR1	TGGCTGTAT TCTGCTCGT GG	AATGTCCCAA ACGTCACCAG	real-time PCR	56	348

Primers were designed in our laboratory by the Vector NTI Deluxe 4.0 software (InforMax, USA, Maryland).

Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

* Primers used for amplification were described [49].

Complementary DNA PCR templates were generated from Dnase I-treated total RNA (2 µg per reaction) by SuperScript™ II Rnase H⁻ reverse transcriptase (Invitrogen, KRD s.r.o., Prague, Czech Republic). For the quantitation of mRNA levels of selected genes a real-time PCR was performed using 0.2 ml thin-walled tubes with flat caps (Abgene, Surrey, Great Britain). Reaction mixture contained 12.5 µl of SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix and 0.25 µl of Internal Reference Dye (Sigma kit, Sigma-Aldrich, Prague), 2.5 µl of each primer (2 µM), 6.25 µl of distilled water and 1 µl of cDNA. Amplification was carried out according to the manufacturer's instruction in the RotorGene 3000 (Corbett Research, Australia). Sequences of PCR primers are listed in Table 1. Semiquantitative PCR analysis was carried out using 100 µmol of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, appropriate concentration of primers (usually 0.4 µM), 1 U Taq DNA polymerase and PCR buffer (Fermentas AB, Vilnius, Lithuania) and 2 µl of cDNA. Various numbers of cycles (25-35) were performed for each set of primers in order to ensure that we are within the logarithmic phase of amplification. The PCR products were separated on 1.2% agarose gels, visualized by ethidium bromide staining, and the relative intensity of the obtained products was measured by phosphorimager FLA-2000 (FujiFilm, Tokyo) using BASReader software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH,

Straubenhardt, Germany). The bands from the phosphorimager scan were quantified with Aida analysis software (Raytest). The results for individual cDNAs corresponding to the amounts of individual mRNAs were related to the amount of standard housekeeping constitutively expressed GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

DNA Sequencing

PCR amplifications of Smad4, Smad2, T β RI (ALK5) and T β RII gene exons were performed using a relevant pair of primers for each exon (Tables 2-5) and the genomic DNA from ML-2 cells. BD AdvantageTM GC Genomic Polymerase Mix (Clontech, Palo Alto, CA) was used to amplify GC-rich genomic DNA. PCR products were isolated by electrophoresis on 2% agarose gels. Specific PCR products were electroeluted from gels and purified by reprecipitation. The sequencing PCR (cycle sequencing) was carried out using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instruction. PCR products were sequenced on capillary genetic analyzer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Specific PCR products synthesised with primers listed in Table 1 and cDNA were attested by sequencing using the same procedure.

Western Blot

Groups of ML-2 cells (10^7 cells, untreated control cells and cells after treatment with TGF- β 1 or other reagents) were collected at 2000 rpm for 10 min (Hettich Universal 16R), washed with cold PBS and lysed in 500 μ l of extraction buffer composed of 10 mM Hepes (pH 7.4), 0.14 M NaCl, 1.5% Triton X100 and protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche, 1 tablet / 10 ml of extraction buffer). After addition of an extraction buffer, cells were let 10 min on ice. Lysates were cleared by 5 min spin at 14000 rpm (Hettich Universal 16R), supernatants were separated and assayed for protein content using Biorad Protein Assay and Biorad SmartSpec Plus spectrophotometer. Samples containing 30 μ g of protein were mixed with the same volume of 2 x SDS loading buffer (100 mM Tris.Cl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromphenol blue, 20% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol) and heated for 5 min at 95 °C. After short spin, samples were separated by SDS electrophoresis using precast 4-20% polyacrylamide gradient mini gels (Invitrogen). Electrophoresis was run at constant voltage 110 V for 1.5 h. (electrophoresis buffer : 25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS, pH: 8.3). Separated proteins were transferred onto Hybond-P PVDF membrane (Amersham) using Hoefer Western Blotting SEMIPHOR system (transfer buffer: 25 mM Tris, 250 mM glycine, 15% methanol, pH: 8.3). Western blotting proceeded for 1 h at the constant current 44 mA per gel. The membranes were left overnight in 0.2% Tween – PBS blocking buffer at 4 °C. The blots were then incubated with specific primary antibody followed by the secondary antibody labeled with horseradish peroxidase. Specific protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence according to manufacturer's protocol (ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire) on autoradiography film (HyperfilmTM ECL, Amersham).

Table 2. Human T β RI primers used for sequencing

Gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product lenght (bp)
T β RIlex1	GAGGCGAGGT TTGCTGGGGT GAGGCA	CATGTTTGAGA AAGAGCAGGA GCGAG	60	256*
T β RIlex2	AAAAATCTCA AGGTTAACAG	ATGAAGAGTTT TTCTTGTAAG	56	261
T β RIlex3	AATAAACATC AACAACGACA	AGCCACAGTC ATATATACATC	56	324
T β RIlex4	CTCAACACAA TCAACAATAT	CTGTAAAGACT TAAAGAGAT	56	253
T β RIlex6	AATACCAATC ACAACCTACA	TATGAAAGAG AAGGGAAAAA	56	200
T β RIlex7	TATTTGGATG AACCTCCTTT	CAACTTCTGCT CATGACAAA	56	161
T β RIlex8	AGTAGGTATG TGGAACAGAG	AATTGCCTAAT ATCAAAAAG	56	203
T β RIlex9	TCCACCTGCT TTCCAGCAC	CCACATGGCTG TTTCCTGG	60	509

* templates with CG-rich areas

Primers were designed in our laboratory by the Vector NTI Deluxe 4.0 software (InforMax, USA, Maryland).

Genbank accession number AY497473

Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>**Table 3. Human T β RII primers used for sequencing**

Gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product lenght (bp)
T β RIIlex1	TCGGTCTATGACGA GCAG	GGGACCCCAGGA AGACC	65	178
T β RIIlex2	GACATCAAGTTCAT TTGAAATTGC	GGAGACAGAGAT ACACTGACTGTG	65	361
T β RIIlex4	CCAACCTCCTTCTCT CCTTGTTTTG	TCCAAGAGGCAT ACTCCTCATAGG	65	444
T β RIIlex5	GCTGGAATTAAATG ATGGGC	GAATAATGCTCG AAGCAACACATG	65	263
T β RIIlex6	CCACTCCTTCCTTC TTATCTTAGC	CCTAAGAGGCAA CTTGGTTGAATC	65	357
T β RIIlex7	GCAGGCACTCAGTC AGCAC	CTCTGTTCTTTGG TGAGAGG	65	385

Primers were designed in our laboratory by the Vector NTI Deluxe 4.0 software (InforMax, USA, Maryland).

Genbank accession number AY675319

Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Table 4. Human Smad2 primers used for sequencing

Gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product lenght (bp)
Smad2ex1	TCCCCTCTCTTCC CCTACCC	CAGGCTTTACC TGCAAGGTG	52	207
Smad2ex2	GGTAGTCTCTACA TCATCCT	GGCAACTTGAA AGGAACACA	57	413
Smad2ex3	AGTAACCAGCAC TACATGCCTGTG	CTTTCAAAATA TACCCCCCTCCC	65	309
Smad2ex5	GTAGGTGGACCC TAGCTTT	TTAGGAGATTC AGAAGGCAA	57	283
Smad2ex6	GGTAGCTGAGAG AAAAGGTAGTG	TTGGTATGCGT CTCAACTTC	57	255
Smad2ex7	GCCAAACTGTT GCACCTT	GTGCCAGCAGA AAAGACTT	57	478
Smad2ex8	CCAGTGCAGGCT GGCATAGAG	GATGTGGCACA CCATGCAATG	65	432
Smad2ex9-10	GCTTCCAAAGTC ACACTGA	ATTTGGAGGCC TCCAACCTT	57	675
Smad2ex11	GCAGTGTACCTA AACATA	AACTTTTGGAT AGTAAAC	51	301

Primers were designed in our laboratory by the Vector NTI Deluxe 4.0 software (InforMax, USA, Maryland).

Genbank accession number AC120349

Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Identification of Apoptotic Cell Death-Annexin V Staining

ML-2 cells (5×10^5 /ml) were incubated for 0-96 h without addition (control) or with addition of DMSO (0.5 µl/ml; control for SB431542 group), TGF-β1 (5 ng/ml and 10 ng/ml), bortezomib (4 nM and 10 nM), SB431542 (5 µM) and with combination of these above-mentioned reagents. Annexin V (Immunotech, Marseille, France) staining was used to assess apoptosis. Staining was determined by flow cytometry using a Coulter Epics XL (Coulter Corporation, FL).

Statistical Analysis

Statistical significance of the experimental results was analyzed by Student's paired t-test. A p-value <0.05 was considered as significant.

Table 5. Human Smad4 primers used for sequencing

Gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')	Annealing temp. (°C)	Product lenght (bp)
Smad4ex1	GCATTGAATCTCTG ACTTAACCAG	CAGTATCTGAAGA GATGGAGCAC	60	599
Smad4ex2	CTGAGTTGGTAGG ATTGTGAGG	CTACAATACTCGGT TTTAGCAGTC	60	470
Smad4ex3	GTTAGATAGCGTTT ATGCTACTTCTG	CAGAGAGGATAGG ACAAAACAAAG	60	230
Smad4ex4	GCTGTTACCGCTGA ATAAATG	CCCAAGTGACTAC ACATAAATAAGC	60	482
Smad4ex5-6	CCATGTTAATGTCT TCTTGTTCC	CTGAATACTACGCT GAGGGAAAC	60	737
Smad4ex7	GCACTTGGCAGAT AGCACTG	CTGTGTTTGTGCGT TTCAATC	60	347
Smad4ex8	GGAAAACTGTGT TGTGGAGTG	CACCGACAATTAA GATGGAGTG	60	437
Smad4ex9	GCTATCTTTTGGTT TTATGTGATC	CATTCTTCCACCC AGATTTC	60	377
Smad4ex10	AGGCATTGGTTTTT AATGTATG	CAACTAATCAAAG AAACTCGTC	58	323 *
Smad4ex11	CCAAAAGTGTGCA GCTTGTTG	GACCTCAGTCTAA AGGTTGTGGG	60 ACC ACAACTT AGACTGAGTC	399

Primers were designed in our laboratory by the Vector NTI Deluxe 4.0 software (InforMax, USA, Maryland).

Genbank accession number AC091551

Genbank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

*Primers used for amplification were described [50].

RESULTS

Effect of TGF- β 1 on ML-2 cell Proliferation and Sequencing of TGF- β 1 Signalling Components

The loss of a growth inhibitory response to TGF- β 1 is a common feature of many cancers where several TGF- β signalling components (T β RII, T β RI, Smad4 and Smad2) were found to be mutated [11]. The proliferation of majority of AML cell lines or primary AML cells is sensitive to inhibition by TGF- β 1 [24-29]. However, we did not find inhibition effect of TGF- β 1 on proliferation of ML-2 cells using [6- 3 H] thymidine incorporation assay (Figures 1-3). The resistance of AML cell proliferation to TGF- β 1 is not specific only for ML-2 cells and for some established cell lines [24-28] but some primary AML cells are also resistant to TGF- β 1 when grown with or without growth factors [24,28,29].

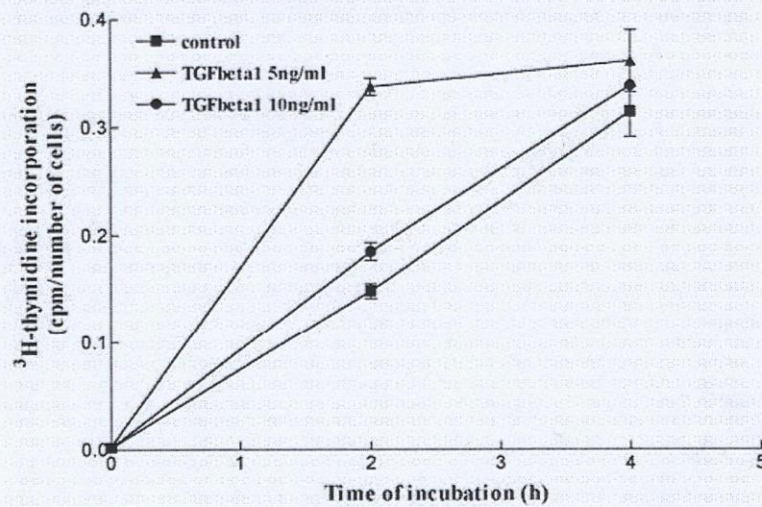


Figure 1. Incorporation of [^3H] thymidine in ML-2 cells. ML-2 cells were preincubated in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum at 37°C , 5% CO_2 and humidified atmosphere in the absence of TGF- β 1 (control) or in the presence of TGF- β 1 (5 or 10 ng/ml) for 24 h. [^3H] thymidine (185 kBq/ml) was then added and its incorporation was measured at 0, 2 and 4h of further incubation (triplicate samples). At these time intervals, cells were collected by centrifugation and were washed three times with ice cold PBS buffer. Cells were then lysed with water and labeled DNA was precipitated with trichloroacetic acid (TCA, final concentration 10%). Precipitate was collected on nitrocellulose membrane filters, washed with cold 10% TCA and radioactivity was counted using Beckman LS 1801 liquid scintillation counter.

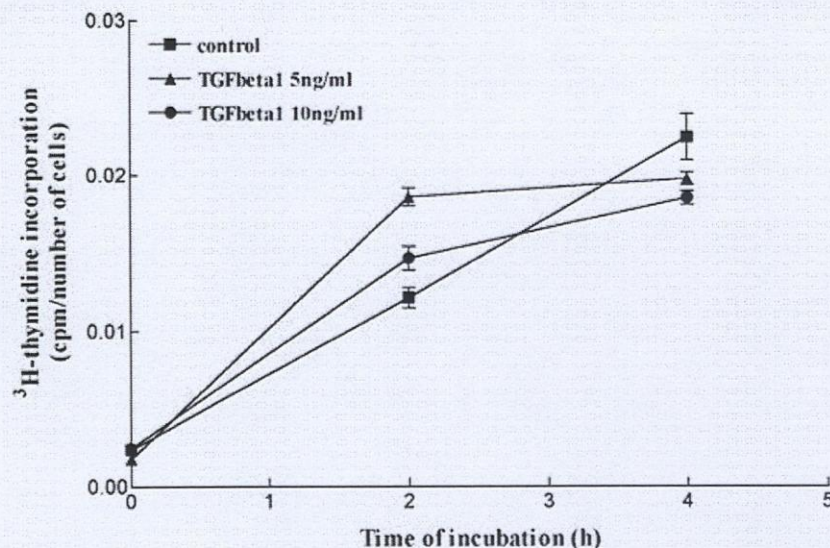


Figure 2. Incorporation of [^3H] thymidine in ML-2 cells. ML-2 cells were preincubated in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum at 37°C , 5% CO_2 and humidified atmosphere in the absence of TGF- β 1 (control) or in the presence of TGF- β 1 (5 or 10 ng/ml) for 72 h. [^3H] thymidine was then added and its incorporation was measured at 0, 2 and 4 h of further incubation as we described in the legend to Figure 1.

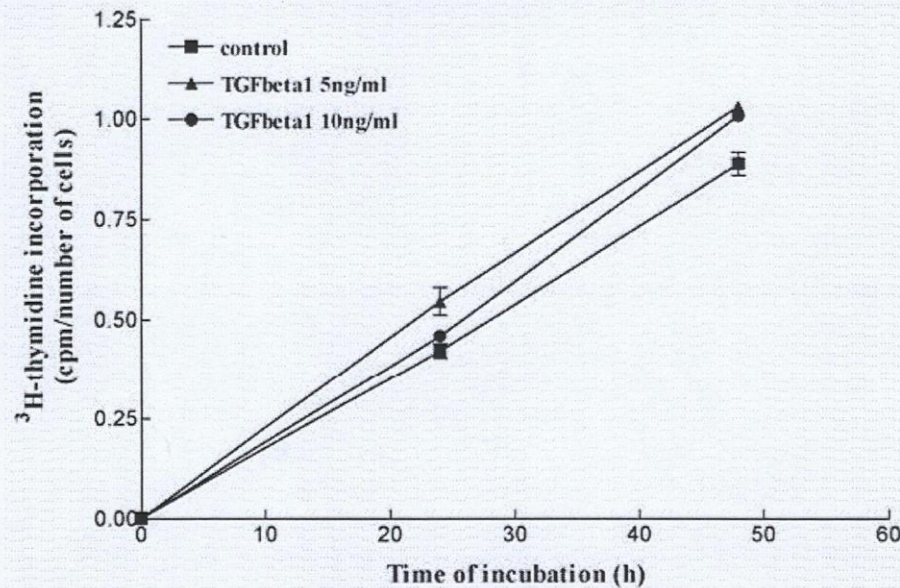


Figure 3. Incorporation of [^3H] thymidine in ML-2 cells. ML-2 cells were incubated in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum at 37°C, 5% CO_2 and humidified atmosphere in the presence of [^3H] thymidine (185 kBq/ml) and in the absence of TGF- β 1 (control) or in the presence of TGF- β 1 (5 or 10 ng/ml). [^3H] thymidine incorporation was measured at 0, 24 and 48 h as we described in the legend to Figure 1.

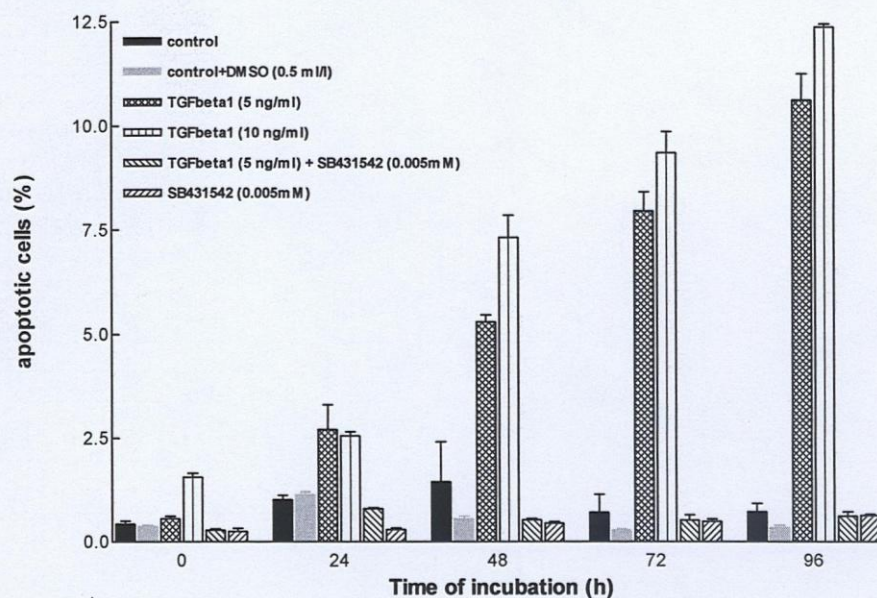


Figure 4. Flow cytometric detection of ML-2 cells apoptosis by staining with annexin V. Identification of apoptotic death was performed as described in the Materials and methods section. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 3$). Significant changes (the P value < 0.05) are marked by asterisk.

One reason for the proliferation resistance of ML-2 cells to growth inhibitory effect of TGF- β 1 could be caused by mutational inactivation of signalling components (TGF- β 1 receptors and Smad proteins /Smad4 and Smad2/). We sequenced exons of these genes in ML-2 cells without detection of any mutation. These results indicate that the resistance of the ML-2 cells to TGF- β 1 is caused by other factors rather than by mutational alteration of the genes in TGF- β 1 signalling pathway.

TGF- β 1 as Inducer of Apoptosis in ML-2 Cells

Staining with annexin V was used to analyze TGF- β 1 as inducer of apoptosis in ML-2 cells (Figure 4). TGF- β 1 significantly increased apoptosis in ML-2 cells but not in ML-2 cells treated simultaneously with SB431542, a specific inhibitor of ALK 4,5 and 7 (Figure 4).

Table 6. The effect of TGF- β 1, anti-TGF- β 1 monoclonal neutralization antibody, MAPK inhibitors and of negative control for the p38 MAPK inhibition studies (SB202474) on the level of mRNAs for signalling components (TGF- β 1 receptors and Smad proteins) and on the level of mRNAs for selected TGF- β 1 target genes

Description	Intensity of genes expression (%) (24h)							
	Control (untreated cells)	TGF- β 1 (5ng/ml)	TGF- β 1 (10 ng/ml)	TGF- β 1 monoclonal antibody (20 μ g/ml)	UO126 (5 μ M)	PD98059 (10 μ M)	SB 203580 (5 μ M)	SB 202474 (5 μ M)
ALK1	100	96	115	40 ↓*	83	121	108	89
T β RI (ALK5)	100	52 ↓*	144 ↑*	99	18 ↓*	54 ↓*	19 ↓*	18 ↓*
T β RII	100	131 ↑*	313 ↑*	260 ↑*	94	100	76 ↓*	150 ↑*
Smad1	100	91	87	98	107	126 ↑*	89	130 ↑*
Smad2	100	102	96	105	87	134	99	133
Smad3	100	93	111	93	88	81	115	76
Smad4	100	74 ↓*	204 ↑*	83	84	135 ↑*	248 ↑*	116
Smad5	100	67 ↓*	122 ↑*	70 ↓*	83	x	132 ↑*	x
Smad7	100	109	115	102	90	120	108	138 ↑*
Id1	100	60 ↓*	55 ↓*	73 ↓*	157 ↑*	193 ↑*	265 ↑*	135 ↑*
JunB	100	185 ↑*	308 ↑*	100	61 ↓*	100	102	115
p21 ^{Waf1/Cip1}	100	201 ↑*	159 ↑*	1750 ↑*	86	104	262 ↑*	117
p27 ^{Kip1}	100	105	124 ↑*	100	78 ↓*	37 ↓*	91	93
cdc25A	100	95	85	125 ↑*	77 ↓*	112	107	100
VEGF	100	81	83	56 ↓*	56 ↓*	90	81	107
RhoA	100	95	107	129 ↑*	122 ↑*	162 ↑*	113	172 ↑*
PAI-1	100	769 ↑*	627 ↑*	62 ↓*	130 ↑*	2091 ↑*	488 ↑*	171 ↑*
IL6	100	0 ↓*	0 ↓*	x	0 ↓*	0 ↓*	0 ↓*	0 ↓*
SnoA	100	310 ↑*	326 ↑*	253 ↑*	437 ↑*	243 ↑*	622 ↑*	224 ↑*
SnoN	100	492 ↑*	887 ↑*	104	576 ↑*	269 ↑*	440 ↑*	85
c-myc	100	63 ↓*	60 ↓*	81	82	26 ↓*	91	146 ↑*
TfR1	100	83	72 ↓*	x	48 ↓*	20 ↓*	76 ↓*	270 ↑*

↓ down regulation

↑ up regulation

* statistically significant (p<0,05)

x experiment was not performed

Regulation of the Expression of Signalling Components (TGF- β 1 Receptors and Smad Proteins) and Selected TGF- β 1 Target Genes. The Effect of Inhibitors of MAPK, Proteasomes and Histone Deacetylases on this Expression

Table 7. The effect of the specific inhibitor (SB431542) of ALK4, 5, 7 and of PI3K inhibitor (LY294002) and of proteasome inhibitors on the level level of mRNAs for signalling components (TGF- β 1 receptors and Smad proteins) and on the level of mRNAs for selected TGF- β 1 target genes

Description	Intensity of genes expression (%) (24h)						
	Control(untreated cells)	SB431542 (5 μ M)	LY294002 (25 μ M)	Proteasome inh. 1 (2.5 μ M)	Proteasome inh. 2 (2.5 μ M)	MG132 (0.5 μ M)	Bortezomib (10nM)
ALK1	100	79 ↓*	43 ↓*	12 ↓*	14 ↓*	10 ↓*	9 ↓*
T β RI (ALK5)	100	67 ↓*	92	45 ↓*	4 ↓*	83	80 ↓*
T β RII	100	34 ↓*	164	6 ↓*	3 ↓*	203 ↑*	34 ↓*
Smad1	100	83	78 ↓*	32 ↓*	75 ↓*	85	x
Smad2	100	84	97	32 ↓*	47 ↓*	55 ↓*	x
Smad3	100	98	99	5 ↓*	14 ↓*	143 ↑*	x
Smad4	100	153 ↑*	119	4 ↓*	15 ↓*	125 ↑*	x
Smad5	100	78 ↓*	105	2 ↓*	0 ↓*	x	x
Smad7	100	111	108	96	48 ↓*	100	68 ↓*
Id1	100	163 ↑*	131 ↑*	105	35 ↓*	250 ↑*	29 ↓*
JunB	100	101	86	108	28 ↓*	106	47 ↓*
p21 ^{Waf1/Cip1}	100	75 ↓*	113	75 ↓*	47 ↓*	1154 ↑*	332 ↑*
p27 ^{Kip1}	100	73 ↓*	141 ↑*	27 ↓*	0 ↓*	462 ↑*	13 ↓*
cdc25A	100	75 ↓*	57 ↓*	6 ↓*	11 ↓*	74 ↓*	162 ↑*
VEGF	100	80	46 ↓*	10 ↓*	13 ↓*	242 ↑*	6 ↓*
RhoA	100	107	97	3 ↓*	205 ↑*	336 ↑*	19 ↓*
PAI-1	100	145 ↑*	212 ↑*	4770 ↑*	12499 ↑*	1458 ↑*	402 ↑*
IL6	100	0 ↓*	388 ↑*	9063 ↑*	803 ↑*	918 ↑*	
SnoA	100	290 ↑*	651 ↑*	163 ↑*	57 ↓*	128 ↑*	326 ↑*
SnoN	100	67 ↓*	316 ↑*	23 ↓*	13 ↓*	105	78 ↓*
c-myc	100	88	78 ↓*	0 ↓*	34 ↓*	113	96
TfR1	100	47 ↓*	28 ↓*	2 ↓*	0 ↓*	9 ↓*	5 ↓*

↓ down regulation

↑ up regulation

* statistically significant (p<0,05)

x experiment was not performed

ML-2 cells were incubated without (control) or with TGF- β 1 and other reagents for 24 h. We prepared cDNA from total RNA isolated from these cells and quantified the amount of specific mRNAs. Results are shown in Tables 6-8. All members of TGF- β 1 signalling pathway are expressed in ML-2 cells and are easily detectable on the mRNA level. Moreover, most of the studied TGF- β 1 target genes (PAI-1, JunB, p21^{Waf1/Cip1}, c-myc, Id1, SnoN) are expressed as it was expected based on published studies [6,9,30-33]. The treatment of ML-2 cells with TGF- β 1 for 24 h increased significantly the level of mRNAs for T β RII, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), JunB, p21^{Waf1/Cip1}, SnoA and SnoN and decreased significantly the level of mRNAs for c-myc and Id1. However, there was no significant effect

of TGF- β 1 on the expression of RhoA, cdc25A and VEGF genes. Our results indicate that the TGF- β 1 signalling cascade for transcriptional regulation appears to be intact in the ML-2 cells.

IL6 mRNA levels were not detectable after TGF- β 1 treatment but these levels were significantly increased after treatment with proteasome inhibitors and HDAIs with exception of 1 mM sodium butyrate. Transferrin receptor 1 (TfR1) mRNA level was slightly decreased by TGF- β 1 treatment (Table 6). However, this decrease of TfR1 mRNA level may be caused by other mechanisms as well, because SB431542, the specific inhibitor of ALK4,5 and 7, reduced TfR1 mRNA level even more than TGF- β 1 (Table7). TfR1 expression was effectively attenuated by proteasome inhibitors and HDAIs (Tables 7,8). Proteasome inhibitors, HDAIs, and iron chelator (deferioxamine mesylate, Desferal) increased the level of PAI-1 mRNA (Table7,8). Some proteasome inhibitors (MG 132 and bortezomib) increased also the level of p21 mRNA (Table 7). Expression of c-myc gene is extensively reduced by HDAIs and Desferal.

Table 8. The effect of histone deacetylase inhibitors and of iron chelator (Desferal) on the level level of mRNAs for signalling components (TGF- β 1 receptors and Smad proteins) and on the level of mRNAs for selected TGF- β 1 target genes

Description	Intensity of genes expression (%) (24h)						
	Control (untreated cells)	HDAI1 (0,5 μ M)	HDAI2 (5 μ M)	HDAI3 (2 μ M)	Apicidin (1 μ M)	Butyrate (1mM)	Desferal (0,1mM)
ALK1	100	90	58	56 ↓	40 ↓	x	43 ↓
T β RI (ALK5)	100	63 ↓	29 ↓	3 ↓	42 ↓	7 ↓	163 ↑
T β RII	100	32 ↓	236 ↑	63 ↓	133	186	147 ↑
Smad1	100	92	86	94	27 ↓	93	68 ↓
Smad2	100	96	98	110	101	96	122
Smad3	100	37 ↓	41 ↓	45 ↓	30 ↓	33 ↓	27 ↓
Smad4	100	55 ↓	118	47 ↓	71 ↓	40 ↓	127
Smad5	100	62 ↓	90	63 ↓	44 ↓	52 ↓	5 ↓
Smad7	100	91	72 ↓	41 ↓	78 ↓	48 ↓	101
Id1	100	74 ↓	297 ↑	171 ↑	83 ↓	153 ↑	125 ↑
JunB	100	70 ↓	88	84	128	87	129
p21 ^{Waf1/Cip1}	100	116	419 ↑	75	214	116	924 ↑
p27 ^{Kip1}	100	17 ↓	34 ↓	48 ↓	5 ↓	39 ↓	76 ↓
cdc25A	100	108	94	89	130	85	122
VEGF	100	64 ↓	137 ↑	151 ↑	192 ↑	100	157 ↑
RhoA	100	154 ↑	209 ↑	1 ↓	2 ↓	0 ↓	0 ↓
PAI-1	100	552 ↑	848 ↑	961 ↑	1474 ↑	796 ↑	6888 ↑
IL6	100	73	648 ↑	4162 ↑	3357 ↑	0 ↓	199 ↑
SnoA	100	117	998 ↑	174 ↑	315 ↑	21 ↓	0 ↓
SnoN	100	62 ↓	503 ↑	97	112	21 ↓	144 ↑
c-myc	100	40 ↓	21 ↓	3 ↓	0 ↓	21 ↓	4 ↓
TfR1	100	26 ↓	5 ↓	2 ↓	23 ↓	6 ↓	194 ↑

↓ down regulation

↑ up regulation

* statistically significant (p<0,05)

x experiment was not performed

Western Blot Analysis of Protein Levels

In order to test whether SnoN is increased also on protein level in ML-2 cells after TGF- β 1 treatment as well, we carried out Western blot analysis (Figure 5). We detected the increased level of SnoN after TGF- β 1 treatment of ML-2 cells for 24 h. Our results suggest that the increased level of SnoN negatively regulates TGF- β 1 signalling in ML-2 cells and is involved in the resistance of ML-2 cells to inhibition of proliferation after TGF- β 1 treatment. Moreover, we did not succeed in detection of key cell cycle regulation molecules, cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} by Western blot analysis in untreated ML-2 cells and after treatment with TGF- β 1 for 24 h (results not shown). Deregulation of the cell cycle is one of the critical events that drive ML-2 cells into uncontrolled proliferation resistant to inhibition by TGF- β 1 treatment.

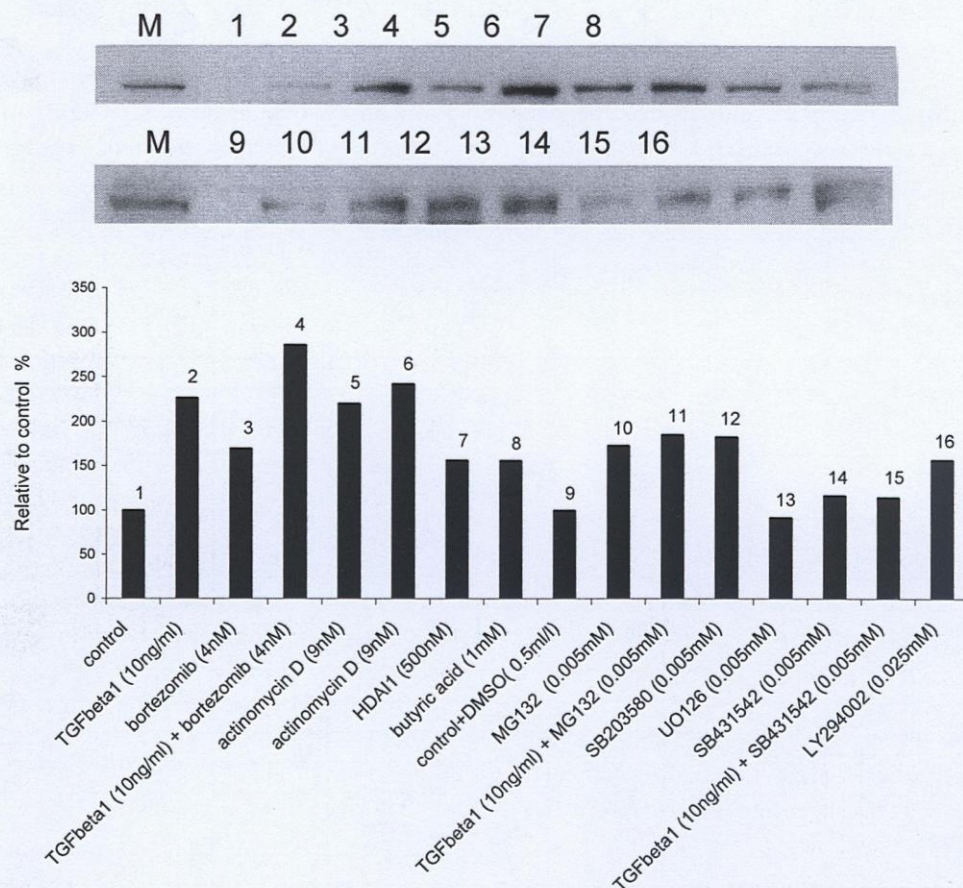


Figure 5. Western blot analysis of SnoN expression in ML-2 cells. ML-2 cells were incubated without addition (control) or with addition (TGF- β 1 10 ng/ml/ or other agents) for 24 h. Cells were collected, washed and lysed and Western blot analysis was performed as described in the Materials and methods section. Marker (SnoN protein in HeLa cell nuclear extract as positive control) is indicated by M.

CONCLUSION

In previous studies, heterogeneous responses of the proliferation of more than 10 human myeloid leukemia cell lines to TGF- β 1 were observed [27-29]. The effect of TGF- β 1 on ML2 cell line was not yet investigated. We showed that the proliferation of the human acute myelomonocytic leukemia cell line ML-2 was resistant to TGF- β 1.

The resistance of ML-2 cells proliferation to TGF- β 1 is not caused by anti-apoptotic effect of TGF- β 1 which was found in human monocytic leukemia U937 cells [34]. We clearly demonstrated a weak pro-apoptotic effect of TGF- β 1 on ML-2 cells. This effect is mediated through T β RI (ALK5) as we proved with specific inhibitor of ALK5 (SB431542). The death-inducing activity of TGF- β 1 is restricted to certain cell types, to a certain state of differentiation, and most notably, to the presence or absence of other growth factors in the incubation medium [35,36].

All members of TGF- β 1 signalling pathway (receptors and Smad proteins) and all selected TGF- β 1 target genes were detected in ML2 cells on mRNA level. TGF- β 1 has no significant effect on the expression of RhoA, cdc25A and VEGF genes in ML-2 cells. However, TGF- β 1 stimulates VEGF gene transcription in other cell types [37,38]. RhoA and its effector kinase p160^{ROCK} directly inhibit the activity of Cdc25A to induce cell-cycle arrest on TGF- β 1 treatment in epithelial cells [7]. Thus, Smad-independent signalling through RhoA is a key event in TGF- β 1 inhibition of the cell cycle in epithelial cells. Recently, it was found that the RhoA/ROCK pathway was necessary for the upregulation of p21^{Waf1/Cip1} and for the downregulation of c-myc proteins [39]. The fact that RhoA mRNA level does not respond to TGF- β 1 in ML-2 cells can also contribute to the resistance of ML-2 cells proliferation to TGF- β 1 treatment. SnoN is a nuclear corepressor for Smad4, which interacts with other transcriptional corepressors and with HDAC [40,41]. Since we also found increased SnoN on the protein level after TGF- β 1 treatment, it is possible that SnoN contributes to unresponsivity of ML-2 cells to TGF- β 1. In the most cells, TGF- β 1 induces degradation of SnoN [38,39]. Inability of TGF- β 1 to cause SnoN degradation can lead to resistance to TGF- β 1-induced growth arrest [42]. However, proteasome inhibitors and combinations of TGF- β 1 and proteasome inhibitors increased SnoN protein level in ML-2 cells to a bigger extent than TGF- β 1 alone. The direct evidence that SnoN contributes to the resistance of ML-2 cells proliferation to TGF- β 1 may be revealed in the future experiments, possibly by the use of stable antisense SnoN transfection or using anisomycin [43,44]. Anisomycin, antibiotic isolated from *Streptomyces griseolus*, is able to downregulate SnoN via proteasome but through mechanism independent of Smad and MAPK activation [44]. Downregulation of SnoN by these agents might lead to inhibition of ML-2 cells proliferation by TGF- β 1.

We could not detect proteins p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} by Western blot analysis in untreated ML-2 cells and after treatment with TGF- β 1 for 24 h. This fact can also contribute to resistance to TGF- β 1-induced growth arrest in ML-2 cells. Protein p21^{Waf1/Cip1} is inducible in the course of differentiation of ML-2 cells but is undetectable in uninduced ML-2 cells [45]. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1} can be regulated at post-transcriptional level [46] and both p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} are unstable proteins degraded in proteasomes [47,48]. The use of proteasome inhibitors for the treatment of ML-2 cells did not lead to detectable amounts of both proteins by Western blot analysis.

This work brings the first evidence that abnormal increased level of SnoN and undetectable levels of important cell cycle regulators, proteins p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip} in ML-2 cells may lead to the resistance of ML-2 cells proliferation to inhibition effect of TGF- β 1. Agents that can restore normal levels of these proteins can block the resistance of ML-2 cells proliferation to inhibition effect of TGF- β 1 and may be used in future therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Blazena Krasna for expert technical support and Dr. Veronika Ullmannova for help with real time PCR quantification of p21^{Waf1/Cip1} mRNA levels in the initial phase of the study. This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic (grant IGA MZ CR NC/7605-3) and VZ 00023736 from the Ministry of Health, Czech Republic.

REFERENCES

- [1] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signalling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
- [2] Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 659-93.
- [3] Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2626-31.
- [4] Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β receptors. *EMBO J* 2002; 21: 1743-53.
- [5] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-84.
- [6] Chen C-R, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell* 2002; 110: 19-32.
- [7] Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL. TGF- β -induced RhoA and p160^{ROCK} activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15548-53.
- [8] Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15^{Ink4B} transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* 2000; 19: 5178-93.
- [9] Pardali K, Kurisaki A, Morén A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakas A. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21^{WAF1/Cip1} regulation by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 2000; 275: 29244-56.
- [10] Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 2000; 96: 2022-36.
- [11] Derynck R, Akhurst J, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117-29.

- [12] Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 22-9.
- [13] Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8621-23.
- [14] Bachman KE, Park BH. Dual nature of TGF- β signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol* 2004; 17: 49-54.
- [15] Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor- β signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 2003; 17:1731-7.
- [16] Lin H-K, Bergmann S, Pandolfi PP. Deregulated TGF- β signaling in leukemogenesis. *Oncogene* 2005; 24: 5693-700.
- [17] Larsson J, Blank U, Helgadottir H, Bjornsson JM, Ehinger M, Goumans MJ et al. TGF- β signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. *Blood* 2003; 102: 3129-35.
- [18] Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J* 1999; 18: 1280-91.
- [19] Jakubowiak A, Pouponnot C, Berguido F, Frank R, Mao S, Massague J et al. Inhibition of the transforming growth factor- β 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. *J Biol Chem* 2000; 275: 40282-7.
- [20] Kurokawa M, Mitani K, Imai Y, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H. The t (3;21) fusion product AML1/Evi1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor- β -mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 1998; 92: 4003-12.
- [21] Sood R, Talwar-Trikha A, Chakrabarti SR, Nucifora G. MDS1/Evi1 enhances TGF- β 1 signaling and strengthens its growth inhibitory effect but the leukemia-associated fusion protein AML1/MDS1/Evi1, product of the (3;21), abrogates growth-inhibition in response to TGF- β 1. *Leukemia* 1999; 13: 348-57.
- [22] Palumbo A, Minowada J, Erikson J, Croce CM, Rovera G. Lineage infidelity of a human myelogenous leukemia cell line. *Blood* 1984; 64: 1059-63.
- [23] Dybedal I, Jacobsen SEW. Transforming growth factor β (TGF- β), a potent inhibitor of erythropoiesis: neutralizing TGF- β antibodies show erythropoietin as a potent stimulator of murine burst-forming unit erythroid colony formation in the absence of a burst-promoting activity. *Blood* 1995; 86: 949-57.
- [24] Taetle R, Payne C, Dos Santos B, Russell M, Segarini P. Effects of transforming growth factor- β 1 on growth and apoptosis of human acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 1993; 53: 3386-93.
- [25] Drexler HG, Zaborski M, Quentmeister H. Cytokine response profiles of human myeloid factor-dependent human leukemia cell lines. *Leukemia* 1997; 11: 701-9.
- [26] Drexler HG, Meyer C, Zaborski M, Uphoff CC, Quentmeister H. Growth-inhibitory effects of transforming growth factor- β 1 on myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* 1998; 22: 927-38.
- [27] Hu X, Zuckerman KS. Cell cycle and transcriptional control of human myeloid leukemic cells by transforming growth factor beta. *Leuk Lymphoma* 2000; 38: 235-46.
- [28] Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S et al. Mutations of Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis. *Oncogene* 2001; 20: 88-96.

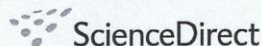
- [29] Koschmieder S, Hofmann W-K, Kunert J, Wagner S, Ballas K, Seipelt G et al. TGF β -induced SMAD2 phosphorylation predicts inhibition of thymidine incorporation in CD34⁺ cells from healthy donors but not from patients with AML. *Leukemia* 2001; 15: 942-9.
- [30] Westerhausen DR, Hopkins WE, Billadello JJ. Multiple transforming growth factor-beta inducible elements regulate expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 1092-100.
- [31] Pertovaara L, Sistonen L, Bos TJ, Vogt PK, Keski-oja S, Alitalo K. Enhanced jun gene expression is an early genomic response to transforming growth factor β stimulation. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1255-62.
- [32] Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto M, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor- β : expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 257-68.
- [33] Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999; 286: 771-4.
- [34] Lee J, Park B-J, Park J-H, Yang M-H, Chi C-G. TGF- β 1 inhibition of apoptosis through the transcriptional up-regulation of Bcl-X_L in human monocytic leukemia U937 cells. *Exp Mol Med* 1999; 31: 126-33.
- [35] Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 1-14.
- [36] Sánchez-Capelo A. Dual role for TGF- β 1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 15-34.
- [37] Benckert C, Jonas S, Cramer T, von Marschall Z, Schäfer G, Peters M et al. Transforming growth factor β 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1083-92.
- [38] Wang L, Kwak JH, Kim SI, He Y, Choi ME. Transforming growth factor- β 1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase 3-p38 α and p38 δ mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 33213-19.
- [39] Kamaraju AK, Roberts AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in TGF- β -mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280: 1024-36.
- [40] Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 1-8.
- [41] Luo K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 65-70.
- [42] Edmiston JS, Yedual WA, Chung TD, Lebman DA. Inability of transforming growth factor- β to cause SnoN degradation leads to resistance to transforming growth factor- β -induced growth arrest in esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 4782-8.
- [43] Poser I, Rothhammer T, Dooley S, Weiskirchen R, Bosserhoff AK. Characterization of Sno expression in malignant melanoma. *Int J Oncol* 2005; 26: 1411-17.
- [44] Vázquez-Macias A, Ruiz-Mendoza AB, Fonseca-Sánchez MA, Briones-Orta MA, Macias-Silva M. Downregulation of Ski and Sno co-repressors by anisomycin. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3701-6.

- [45] Ullmannova V, Stöckbauer P, Hradcova M, Soucek J, Haskovec C. Relationship between cyclin D1 and p21^{Waf1/Cip1} during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* 2003; 27: 1115-23.
- [46] Le NTV, Richardson DR. Potent iron chelators increase the mRNA levels of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{CIP1/WAF1}, but paradoxically inhibit its translation: a potential mechanism of cell cycle dysregulation. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1045-58.
- [47] Chen X, Chi Y, Bloecher A, Aebersold R, Clurman BE, Roberts JM. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21^{Cip1}. *Mol Cell* 2004; 16: 839-47.
- [48] Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, Frizzera G, Chilosi M, Corato A et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 619-26.
- [49] Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and Smad molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer* 2000; 89: 251-8.
- [50] Takahura S, Okamoto A, Saito M, Yasuhara T, Shinozaki H, Isonishi S et al. Allelic imbalance in chromosome band 18q21 and SMAD4 mutations in ovarian cancers. *Gen Chrom Cancer* 1999; 24: 264-71.

CEBPA polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. Fuchs O., Provaznikova D., Kocova M., Kostecka A., Neuwirtova R., Kobylka P., Cermak J., Brezinova J., Schwarz J., Salaj P., Klamova H., Maaloufova J., Lemez P., Novakova L., Benesova K. *Blood Cells Mol.Diseases* 2008,40:401-405



Available online at www.sciencedirect.com



Blood Cells, Molecules, and Diseases 40 (2008) 401–405

BLOOD CELLS,
MOLECULES,
&
DISEASES

www.elsevier.com/locate/ybcmd

CEBPA polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma

Ota Fuchs^{a,*}, Dana Provaznikova^a, Marcela Kocova^a, Arnost Kostecka^a, Pavla Cvekova^a,
Radana Neuwirtova^b, Petr Kobylka^a, Jaroslav Cermak^a, Jana Brezinova^a, Jiri Schwarz^a,
Jana Markova^a, Peter Salaj^a, Hana Klamova^a, Jacqueline Maaloufova^a, Petr Lemez^c,
Ludmila Novakova^c, Katerina Benesova^a

^a Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Cell Physiology, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic

^b General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

^c Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

Submitted 19 November 2007

Available online 8 January 2008

(Communicated by M. Lichtman, M.D., 27 November 2007)

Abstract

The transcription factor CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α is a myeloid-specific transcription factor which is required for normal myeloid differentiation. C/EBP α is encoded by an intronless gene that is 2783 bp long and maps to human chromosome 19q13.1. C/EBP α is a member of the basic region leucine zipper (bZIP) class of DNA-binding proteins. The loss of function of C/EBP α has leukemogenic potential. Four types of polymorphisms and 25 mutations (3 already known mutations and 22 novel mutations) were detected in *CEBPA* (gene for the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α) in analysed samples from 390 patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and hematologic malignancies. *CEBPA* mutations were found in 14/152 (9.2%) of acute myeloid leukemia (AML) patients' samples, 6/143 (4.2%) of MDS patients' samples, 2/56 (3.6%) of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients' samples and 2/39 (5.1%) of multiple myeloma (MM) patients' samples. No C/EBP α mutations were detected in healthy donors (41 individuals). We discuss how these mutations can affect the cellular function of C/EBP α and block the myeloid differentiation.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *CEBPA* mutations; Acute myeloid leukemia; Myelodysplastic syndrome; Multiple myeloma; Non-Hodgkin's lymphoma

Introduction

The CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) is the founding member of a family of related leucine zipper transcription factors that play important roles in myeloid differentiation [1–5]. Members of this family consist of N-terminal transactivation domains, a DNA-binding basic domain, and a C-terminal leucine rich dimerization region (Fig. 1). The dimerization domain, termed as “leucine zipper”, contains leucine repeats that

intercalate with leucine repeats of the dimer partner forming a coiled coil of α helices in parallel orientation. C/EBP α mRNA is translated into two major proteins, C/EBP α p42 (42 kDa) and C/EBP α p30 (30 kDa) by a ribosomal scanning mechanism in which a fraction of ribosomes ignore the first two AUG codons and initiate translation at the third AUG codon located 357 nucleotides downstream of the first one (Fig. 1). The 30 kDa protein lacks the transactivating domain TAD1 (Fig. 1) and was shown to inhibit DNA binding and transactivation by C/EBP α p42 [6]. C/EBP α p30 fails to induce myeloid differentiation [5,7]. Targeted inactivation of C/EBP α in mice demonstrates its importance in the proper development and function of liver, adipose tissue, lung and haematopoietic

* Corresponding author. Fax: +420 221977370.

E-mail address: Ota.Fuchs@uhkt.cz (O. Fuchs).

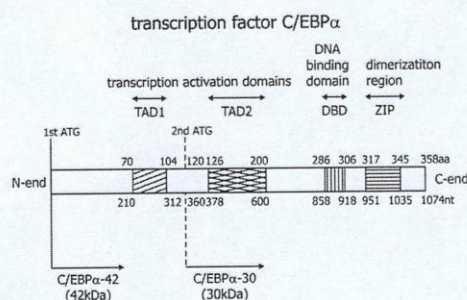


Fig. 1. Schematic representation of the domain structure of C/EBPα. Numbers directly above the schema indicate the amino acids of the human C/EBPα. Numbers directly under the schema indicate nucleotides (GenBank Accession No. NM_004364.2). The full-length, 42 kDa form of C/EBPα protein and shorter 30 kDa form of the protein are also shown.

tissues [8–10]. C/EBPα is highly expressed in these differentiated tissues where it controls differentiation-dependent gene expression and inhibits cell proliferation [11]. Learning more about the precise molecular functions of the C/EBPα protein and how these are affected by leukemogenic mutations should lead to an improved understanding of the cellular functions that are disrupted in patients with AML and other hematologic malignancies. We studied the presence of polymorphisms and mutations in the *CEBPA* of patients with hematologic malignancies.

Materials and methods

Genomic DNA, RNA and cDNA preparation

After informed consent patient-derived bone marrow or peripheral blood mononuclear cells (152 AML, 143 MDS, 39 MM and 56 NHL patients' samples) were Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) purified and total RNA and genomic DNA were isolated. Complementary DNA was synthesised from total RNA using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Identification of *CEBPA* mutations

The PCR reaction was carried out using genomic DNA or cDNA and Advantage-GC Genomic Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA). Two or in some cases four overlapping primer pairs, which cover the entire coding region of human *CEBPA*, were used [6]. In some samples with abnormal sequencing results further pair of PCR primers was exploited (BF, BR) [12]. The positions of the primers complementary to the C/EBPα cDNA sequence (GenBank Accession No. U34070) were FPP1 (562–585) 5'-TCGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC-3', RPP1 (1114–1137) 5'-CTGGTAAGGGAAGA-GGCCGGCCAG-3', FPP2 (1060–1079) 5'-CCGCTGGTGATCAAGCAGGA-3', RPP2 (1739–1762) 5'-CACGGCTCGGGCAAGCCTCGAGAT-3', F1 (563–582) 5'-CGCCATG-CCGGGAGAACTCT-3', R1 (850–869) 5'-GCCTTGCCCTTCTCTGCTG-3', F2 (829–

848) 5'-GACCTGTTCCAGCACAGCCG-3', R2 (1122–1141) 5'-GCGGCTGGTAAGGGAAGA-GG-3', F3 (1084–1103) 5'-CGCGAGGAGGATGAAGCCAA-3', R3 (1426–1450) 5'-CCCGGTACTCGTTGCTGTTCTTGTG-3', F4 (1404–1423) 5'-GGGCAAGGCAAGAA-GTCGG-3', R4 (1651–1670) 5'-CCTCACGCGCAGTTGCCCAT-3', BF (816–835) 5'-CGAGTTCCTGGCCGACCTGT-3', BR (1119–1138) 5'-GCTGGTAAGGGAAGAGGCCG-3'. PCR was performed in 25 μL reaction containing 40 mmol/L Tris-HCl (pH 9.3 at 25 °C), 85 mmol/L KOAc, 5% DMSO, 0.1% DMSO, 1.1 mmol/L Mg(OAc)₂, 1 mol/L GC-Melt (Clontech Laboratories, Inc.), 0.2 mmol/L each of dATP, dTP, dGTP, and dTTP, 0.2 μmol/L each of forward and reverse primer, 1.7 U of *TiH* DNA Polymerase from Advantage GC Genomic Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.) and 50 ng genomic DNA. Amplification was performed with an initial heat denaturation step for 4 min at 94 °C followed by 39 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 1 min of annealing at 65 °C (FPP1-RPP1 and F1-R1, 64 °C for FPP2-RPP2, 63 °C for F2-R2, 60 °C for F3-R3, F4-R4 and BF-BR) and 100 s of elongation at 72 °C in the Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). PCR products were electrophoresed on agarose gels, electroeluted from the pieces of gel, purified and sequenced using BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) in both directions on ABI 3100 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems). GenBank Accession No. NM_004364.2 was used for evaluation of the obtained sequences. Some earlier papers about *CEBPA* mutations used GenBank Accession No. U34070 and therefore our results are described according to both GenBank Accessions No. NM_004364.2 and No. U34070.

Results and discussion

We detected four types of polymorphisms in *CEBPA* (Table 1). Most frequent type of polymorphism in *CEBPA* in Czech

Table 1
Summary of patient samples examined for *CEBPA* polymorphisms and mutations

Screened individuals	No.	P1 ^a hom. ^c	P1 ^a het. ^c	P2 ^b hom. ^c	P2 ^b het. ^c	P3 ^c hom. ^c	P3 ^c het. ^c	P4 ^d het. ^c	Mutations het.
Healthy persons	41	0	0	1	1	6	2	0	
AML	152	0	0	3	1	30	8	14	
MDS	143	0	3	0	1	4	35	8	6
MM	39	0	1	0	2	0	8	4	2
NHL	56	0	1	0	1	1	14	3	2

^a P1-polymorphism 402 G>A according to GenBank Accession No. NM_004364 and 993 G>A according to GenBank Accession No. U34070.

^b P2-polymorphism 573 C>T according to GenBank Accession No. NM_004364 and 1164 C>T according to GenBank Accession No. U34070.

^c P3-polymorphism 690 G>T according to GenBank Accession No. NM_004364 and 1281 G>T according to GenBank Accession No. U34070.

^d P4-polymorphism 584–589dup according to GenBank Accession No. NM_004364 and 1175–1180dup according to GenBank Accession No. U34070.

^e Homozygous.

^f Heterozygous.

Republic is P3 polymorphism 690 G>T according to GenBank Accession No. NM_004364.2 and 1281 G>T according to GenBank Accession No. U34070 (Table 1). This type of

polymorphism was detected in all groups of screened individuals and was present not only in heterozygous but also in homozygous form. The rarest type of polymorphism is P1 (Table 1), which was

Table 2
Characteristics of patients carrying *CEBPA* coding region mutations in 390 screened patients^a

Patient No.	Disease	Age/sex	FAB	Cytogenetics	Nucleotide change ^b	Nucleotide change ^c	Amino acid change	Comment
14618	AML	63/F	ND	46,XX,inv(9)[22]	600_1055del	1191_1646del	H200_K352del insQ	Deletion of TAD2, DBD and ZIP
11858	AML	76/F	ND	41–45,XX, complex change of karyotype	924_925insTG 638_1114del	1515_1516insTG 1229_1705del	E309fsX318 C213_A358delATGdelX243	Frameshift between DBD and ZIP, stop in ZIP
10741	AML	79/F	ND	46,XX[22]	541del	1132del	Y181fsX316	Freshet between TAD1 and TAD2, stop between DBD and ZIP
B042	AML	48/F	M1	46,XX[13]	542_543insA	1133_1134insA	Y181X	Stop between TAD1 and TAD2
10	AML	29/M	M1	46,XY,22p+ [22]	68del	659del	P23fsX159	Frameshift before TAD1, stop between TAD1 and TAD2
8	AML	68/F	ND	46,XX[22]	912_929del 68del	1503_1520del 659del	Q305_T310del P23fsX159	Deletion in DBD Frameshift before TAD1, stop between TAD1 and TAD2
23	AML	56/M	ND	46,XY[22]	61A>G	652A>G	S32G	Substitution before TAD1
11460	AML	73/M	ND	ND	1038_1213del 1037_1038insT	1629_1804del 1629_1630insT	E347fsX363	Frameshift in stop region and larger protein
15671	AML	80/M	ND	46,XY[10]/47,XY,+8[1]	260_411del	851_1002del	Q87fsX119	Frameshift and stop in TAD2, deletion of TAD1
11710	AML	68/M	M4	46,XY[22]	392_393insA	983_984insA	Y131X	Stop between TAD1 and TAD2
14747	AML	74/M	M4	46,XY[9]/47,XY,+8[13]	912_913insTTG 722_746 del	1503_1504insTTG 1313_1337del	K304_Q305insL L241fsX313	Insertion in DBD Frameshift in DBD, stop between DBD and ZIP
15609	AML	67/M	M6	46,XY[16]/44~54,XY, heterodiploidy[4]	899 G>T	1490 G>T	R300L	Substitution in DBD
18	AML	61/M	ND	46,XY[22]	656_794del	1247_1385del	H219fsX272	Deletion, frameshift and stop between TAD1 and TAD2
15296	AML	50/F	M0	46,XX[5]	238_239insG	829_830insG	D80fsX107	Frameshift and stop between TAD1 and TAD 2, therapy induced mutation
15901	MDS	76/F	ND	ND	18_389del	609_980del	Y7_G130del	Deletion of TAD1
15523	MDS	25/F	ND	46,XX[18]	260_411del	851_1002del	Q87fsX119	Frameshift and stop in TAD2, deletion of TAD1
15899	MDS	75/F	ND	ND	500_502del	1091_1093del	E167del	Deletion between TAD1 and TAD2
15928	MDS	53/F	ND	ND	311_313del	902_904del	G104del	Deletion in TAD1
12003	MDS-RAEB	60/F	ND	46,XX[22]	477_478insGTCCCCC	1068_1069insGTCCCCC	I160fsX171	Stop in TAD2
14849	MDS-RAEB	65/M	ND	46,XY[19]/47,XY,+8[3]	1069_1073del	1660_1664del	A358fs X420	Frameshift in stop region and larger protein
15214	MM	53/M	–	ND	1038_1213del 1037_1038insT	1629_1804del 1629_1630insT	E347fsX363	Frameshift in stop region and larger protein
15163	MM	43/F	–	46,XX[22]	1038_1213del 1037_1038insT	1629_1804del 1629_1630insT	E347fsX363	Frameshift in stop region and larger protein
11715	NHL	55/M	–	46,XY[19]/ polyploidy[22]	1038_1213del 1037_1038insT	1629_1804del 1629_1630insT	E347fsX363	Frameshift in stop region and larger protein
15603	NHL	44/F	–	ND	232_522del	823_1113del	L78_A174del	Deletion of TAD1

ND — not determined.

^a 390 screened patients — see Table 1.

^b GenBank Accession No. NM_004364.2.

^c GenBank Accession No. U34070.

described as silent mutation by Gombart et al. [13]. Polymorphism P4 (Table 1) was first reported as a mutation [14,15]. Lin et al. [15] detected this mutation in 7 (39%) of 19 healthy volunteers and in 20 (20%) of the AML patients. AML patients remained positive for this mutation at complete remission and the authors considered this mutation as insignificant change for leukemogenesis. Recently, it has been demonstrated that this in-frame insertion of six nucleotides in the second transactivation domain (TAD2) of C/EBP α represents a germline polymorphism (P194_H195dup) in proline-histidine rich region of C/EBP α [16,17]. This type of polymorphism was also shown in healthy individuals by Resende et al. [16]. We confirmed these results and we found two healthy persons (5%), heterozygous for P4 polymorphism in 40 screened healthy persons. Valk et al. [18] described in a study of 285 AML cases that *CEBPA* mutations are present predominantly in two distinct gene expression clusters but in-frame insertion of six nucleotides (P4 polymorphism) did not belong to these gene expression clusters. In vitro studies [19] have suggested that this proline-histidine rich region of C/EBP α may play a role in regulation of proliferation through the inhibition of two key cyclin-dependent kinases (cdk2 and cdk4) that drive cell cycle progression but in vivo experiments did not support this observation [20]. Resende et al. [16] further speculate that some other sequence alterations (for example 902_904del according to GenBank Accession No. U34070 described in our study in Table 2) might also represent unrecognized germline polymorphism. 902_904del in the region TAD1 means G104del and might have a functional consequence and has not yet been found to be present in healthy persons.

We found 25 various mutations in *CEBPA* coding region in 390 screened patients and no *CEBPA* mutation in 41 examined healthy controls (Table 2). *CEBPA* mutations were found not only in AML patients but also in MDS, NHL and MM patients. Majority of mutations are deletions in the N-terminal and C-terminal regions. Three *CEBPA* mutations in Table 2 (68del, 912_913insTTG and 311_313del, GenBank Accession No. NM_004364.2) were described in previous studies by other research groups [12,14,21,22]. Smith et al. [22] described a family with three members carrying the identical *CEBPA* mutation 68del. The 68delC *CEBPA* mutation resulted in the presence of five cytosine residues, whereas there are six cytosine residues in healthy controls. This N-terminal frame-shift *CEBPA* mutation causes truncation of the 42 kDa C/EBP α (stop codon between TAD1 and TAD2) and overproduction of a 30 kDa isoform that lacks TAD1 but retains TAD2, DBD and ZIP domains. 30 kDa isoform predominates and functions in a dominant negative manner resulting in a loss of C/EBP α function. It has been found that this inactivating *CEBPA* mutation is associated with long latency period (10 to 30 years) before the onset of AML [22]. One of three affected family members had a second *CEBPA* mutation, but only at the time of diagnosis. A second genetic hit that would lead to AML is probably necessary. The 68del mutation has also been reported in two cases of sporadic AML [21]. 912_913insTTG is connected with another mutation (Table 2) also in *de novo* AML patients described by Liang et al. [12].

As far as we know, the remaining *CEBPA* mutations described in Table 2 have not yet been reported. All patients with mutations

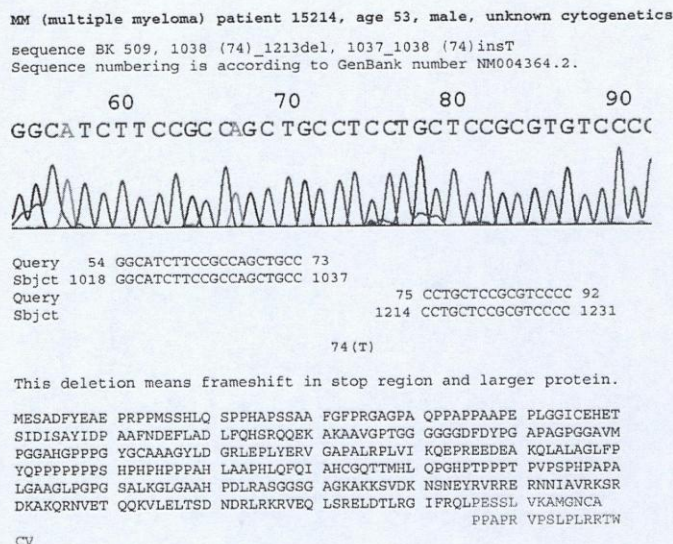


Fig. 2. An example of detection of mutation in *CEBPA*. Sequencing chromatogram of patient 15214 with multiple myeloma indicating the presence of the novel heterozygous mutations at cDNA nucleotide positions 1038 (74)_1213del and 1037_1038 (74)insT (GenBank Accession No. NM004364.2) is presented. Amino acid sequence of the mutated protein is compared to wild type sequence (lower panel). The same mutations were detected in *CEBPA* of three other patients (AML patient 11460, MM patient 15163 and NHL patient 11715).

in our study were compound heterozygotes. N-terminal mutations without frameshift (patients No. 15603 and 15928) result in protein very similar to 30 kDa isoform of C/EBP α . Further N-terminal frame-shift *CEBPA* mutations (patients No. 11710, 15523 and 15671) are associated with truncated C/EBP α and a loss of C/EBP α function. On the other hand, these truncated proteins cannot dimerise with 42 kDa C/EBP α and inhibit its function. Some mutations in C-terminal regions of C/EBP α (patients No. 11460, 11715, 14849, 15214 and 15613) represent cases, where original stop codon is lost and translation ends on further stop codon. The result of these changes is a larger protein that contains all functional domains but its ability to dimerise can be affected and blocked. In Fig. 2, an example of these mutations is shown (patient No. 15214). This novel deletion mutation (1038 (74)_1213del, 1037_1038 (74)insT) means frameshift in stop region and larger protein (Fig. 2). The same deletion mutation was found in three other patients, AML patient 11460, MM patient 15163 and NHL patient 11715. This change of the structure of C/EBP α is suggested to abrogate the function of the leucine zipper domain on the C-end of C/EBP α . This ZIP domain plays a role in homodimerisation or heterodimerisation of C/EBP α that is required for the function of this transcription factor in the expression of target genes and for its antiproliferative activity.

Acknowledgments

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of Czech Republic NR/9045-3. We would like to thank Blazena Krasna and Martina Skalova for their expert technical assistance.

References

- [1] D.G. Tenen, R. Hromas, J.D. Licht, D.E. Zhang, Transcription factors, normal myeloid development, and leukaemia, *Blood* 90 (1997) 489–519.
- [2] K. Keeshan, G. Santilli, F. Corradini, et al., Transcription activation function of C/EBP α is required for induction of granulocyte differentiation, *Blood* 102 (2003) 1267–1275.
- [3] H.C. Suh, J. Goya, K. Renn, et al., C/EBP α determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation, *Blood* 107 (2006) 4308–4316.
- [4] D. Friedman, C/EBP α induces PU.1 and interacts with AP-1 and NF- κ B to regulate myeloid development, *Blood Cells Mol. Diseases* 39 (2007) 340–343.
- [5] T. Pabst, B.U. Mueller, Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML, *Oncogene* 26 (2007) 6829–6837.
- [6] T. Pabst, B.U. Mueller, P. Zhang, et al., Dominant negative mutations of *CEBPA*, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) in acute myeloid leukaemia, *Nat. Genet.* 27 (2001) 263–270.
- [7] F. D'Alo, L.M. Johansen, E.A. Nelson, et al., The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP α -mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells, *Blood* 102 (2003) 3163–3171.
- [8] N.D. Wang, M.J. Finegold, A. Bradley, et al., Impaired energy homeostasis in C/EBP α knockout mice, *Science* 269 (1995) 1108–1112.
- [9] P. Flodby, C. Barlow, H. Kylefjord, et al., Increased hepatic cell proliferation and lung abnormalities in mice deficient in CCAAT/enhancer binding protein α , *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24753–24760.
- [10] D.E. Zhang, P. Zhang, N.D. Wang, et al., Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 569–574.
- [11] O. Fuchs, Growth-inhibiting activity of transcription factor C/EBP α , its role in haematopoiesis and its tumour suppressor or oncogenic properties in leukaemias, *Folia Biol. (Praha)* 53 (2007) 97–108.
- [12] D.-C. Liang, L.-Y. Shih, C.-F. Juany, et al., *CEBPA* mutations in childhood acute myeloid leukemia, *Leukemia* 19 (2005) 410–414.
- [13] A.F. Gombart, W.-K. Hofmann, S. Kawano, et al., Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein α in myelodysplastic syndromes and myeloid leukemias, *Blood* 99 (2002) 1332–1340.
- [14] S. Fröhling, R.F. Schlenk, I. Stolze, et al., *CEBPA* mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 624–633.
- [15] L.-I. Lin, C.-Y. Chen, D.-T. Lin, et al., Characterization of *CEBPA* mutations in acute myeloid leukemia: most patients with *CEBPA* mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 1372–1379.
- [16] C. Resende, G. Regalo, C. Durães, et al., Genetic changes of *CEBPA* in cancer: mutations or polymorphism? *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 2493–2494.
- [17] B.J. Wouters, I. Louwers, P.J.M. Valk, et al., A recurrent in-frame insertion in a *CEBPA* transactivation domain is a polymorphism rather than a mutation that does not affect gene expression profiling-based clustering of AML, *Blood* 109 (2007) 389–390.
- [18] P.J. Valk, R.G. Verhaak, M.A. Beijnen, et al., Prognostically useful gene expression profiles in acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 1617–1628.
- [19] H. Wang, P. Jakova, M. Wilde, et al., C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of cdk2 and cdk4, *Mol. Cell* 8 (2001) 817–828.
- [20] B.T. Porse, T.A. Pedersen, M.S. Hasemann, et al., The proline-histidine rich CDK2/CDK4 interaction region of C/EBP α is dispensable for C/EBP α -mediated growth regulation in vivo, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 1028–1037.
- [21] S. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, C. Erpelinck, J. Meijer, et al., Biallelic mutations in the *CEBPA* gene and low *CEBPA* expression levels as prognostic markers in intermediate risk AML, *Hematol. J.* 4 (2003) 31–40.
- [22] M.L. Smith, J.D. Cavenagh, T.A. Lister, J. Fitzgibbon, Mutation of *CEBPA* in familial acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 351 (2005) 2403–2407.

SHORT COMMUNICATION

High-resolution melting analysis for detection of MYH9 mutations

DANA PROVAZNIKOVA¹, TEREZA KUMSTYROVA², ROMAN KOTLIN³,
PETER SALAJ¹, VACLAV MATOSKA², INGRID HRACHOVINOVA¹, &
SIMON RITTICH¹

¹*Institute of Haematology and Blood Transfusion, Coagulation Laboratory, Prague, Czech Republic,* ²*Hospital Na Homolce, Molecular Diagnosis Laboratory, Prague, Czech Republic,* and ³*Department of Biochemistry, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic*

(Received 22 November 2007; accepted 18 April 2008)

Abstract

May-Hegglin anomaly (MHA), Sebastian (SBS), Fechtner (FTNS) and Epstein (EPS) syndromes are rare autosomal dominant disorders with giant platelets and thrombocytopenia. Other manifestations of these disorders are combinations of the presence of granulocyte inclusions and deafness, cataracts and renal failure. Currently, MHA, SBS, FTNS and EPS are considered to be distinct clinical manifestation of a single illness caused by mutations of the MYH9 gene encoding the heavy chain of non-muscle myosin IIA (NMMHC-IIA). As the MYH9 gene has a high number of exons, it takes much time and material to use this method for the detection of MYH9 mutations. Recently, a new method has been introduced for scanning DNA mutations without the need for direct sequencing: high-resolution melting analysis (HRMA). Mutation detection with HRMA relies on the intercalation of the specific dye (LC Green plus) in double-strand DNA and fluorescence monitoring of PCR product melting profiles. In our study, we optimized the conditions and used HRMA for rapid screening of mutations in all MYH9 exons in seven affected individuals from four unrelated families with suspected MYH9 disorders. Samples identified by HRMA as positive for the mutation were analysed by direct sequencing. HRMA saved us over 85% of redundant sequencing.

Keywords: MYH9, HRMA, thrombocytopenia, giant platelets, NMMHC-IIA

Introduction

The MYH9 gene encodes human non-muscle myosin heavy chain IIA [1], which is part of a hexameric enzyme complex, which binds actin, has ATPase activity, and is required for motor activity in many different tissues including platelets, leukocytes, kidney, and cochlea. MYH9 plays a role in the normal development and maintenance of these tissues. Mutations in this gene cause a spectrum of autosomal dominant inherited conditions characterized by various combinations of macrothrombocytopenia, neutrophil cytoplasmic inclusions, nephritis, deafness and cataract. MYH9 related disorders include four rare heterogenous phenotypes: May-Hegglin anomaly (MHA), Sebastian (SBS), Fechtner (FTNS) and Epstein syndrome (EPTS) [2]. MYH9 related disorders are

conventionally diagnosed by the presence of granulocyte inclusion bodies on blood smears stained by May-Grünwald-Giemsa (MGG) [3, 4]. The pitfall in using the MGG staining as a diagnostic tool is the possible absence of inclusions in some cases [5], which hampers proper recognition. We also used this method for selecting a group of patients, but primary criteria were platelet size and count.

These problems were overcome by the introduction of genetic linkage and mutational analyses, since every affected individual harbours mutation(s) in the MYH9 gene [6, 7].

The MYH9 gene is located on chromosome 22q11.2 [1] and consists of 40 exons. Mutational analysis involves mainly direct DNA sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products. The high number of exons in the gene makes these diagnostic approaches time and cost inefficient.

Correspondence: Dana Provaznikova, Institute of Haematology and Blood Transfusion, Coagulation Laboratory, Prague, Czech Republic.
E-mail: dana.provaznikova@uhkt.cz

Recently, a new method has been introduced for scanning DNA mutations without the need for direct sequencing, high-resolution melting analysis (HRMA). Mutation detection with HRMA relies on the intercalation of the specific saturation dye (LC Green plus) in double-strand DNA and fluorescence monitoring of PCR product melting profiles.

In this study we have optimized the conditions and examined the feasibility of using HRM analysis for the detection of MYH9 mutations. We applied this to seven patients from four families with suspected MYH9 disorders. Samples identified by HRMA as positive for the mutation were analysed by direct sequencing.

Methods

Patients

Seven patients from four unrelated families with autosomal dominant macrothrombocytopenia were studied. The patients fulfilled these conditions: platelet count $<100 \times 10^9/l$, mpv (medium platelet size) >11 fl; they differed in the presence of the leukocyte inclusions. The patients were chosen as MYH9 on the basis of the platelet size and count and the May-Grünwald-Giemsa staining (see Table I).

PCR

Human genomic DNA was isolated from whole blood (phenol-chloroform extraction). The primer sequences and sizes of the amplicons are listed in Table II (the same couples of primers were used for mutation scanning by DNA sequencing). PCR was performed in 25 μ l reaction volume containing 14 ng genomic DNA, 0.5 μ M primers, 0.2 mM dNTPs, reaction buffer, 0.8 M or 0.4 M DMSO and 1 U of Platinum Taq polymerase using a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Massachusetts, USA) at 95°C for 4 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, specific temperature for each set of primers for 30 s, 72°C for 15 s, with a final step at 72°C for 2 min. After performing PCR 2 μ l LC Green plus (Idaho Technology, Utah, USA) was added, the total volume was 27 μ l. The presence of specific PCR

product was confirmed on 1% agarose gel stained by ethidium bromide; the marker was 50 bp ladder (New England Biolabs, Massachusetts, USA).

HRMA

Samples with LC Green plus (20 μ l) were transferred in a 96-well plate and overlaid with a drop of a mineral oil. The HRMA was performed on a Light Scanner (Idaho Technology), first with the temperature adjusted for 55–95°C, then with a narrower range of temperature.

HRMA results were shown as fluorescence versus temperature graphs. The data were analysed using temperature shifting, difference plots and derivative melting curves in comparison with a control (see Figures 1–3).

DNA sequencing

All exons of the MYH9 gene, including the intron exon boundaries, were PCR-amplified with corresponding intronic primers (Table II). PCR was performed on a PTC-200 thermocycler (MJ Research) at 96°C 20 s, 50°C 20 s, 60°C 4 min for 35 cycles.

For primer design, we used a "Homo Sapiens chromosome 22, complete sequence" as a reference sequence (GenBank, accession NC_00022, gi3135984) and in order to determine the position of mutated nucleotides, we used DNA sequence HS_6802 (GenBank, gi53791226). Both were obtained from www.ncbi.nlm.nih.gov

PCR products were purified using the Invisorb Spin PCRapid kit (Invitex, Berlin, Germany) and sequenced in both directions using the DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, California, USA).

DNA sequencing was performed on ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA).

Results

We used HRMA for a rapid screening of mutations in 40 exons of MYH9 gene. We have optimized PCR for all MYH9 exons; four exons had another DMSO

Table I. Clinical characteristics of studied patients and HRMA and mutation results.

Affected individuals	Platelets count	mpv	Inclusions	Exons marked as mutated in HRMA	Mutation
C367	99.10 ⁹ /l	15.9 fl	Sporadically	5	R1165C
C354	61.10 ⁹ /l	15.1 fl	Sporadically	1	R1165C
M1	48.10 ⁹ /l	16.0 fl	Yes	7	E11841K
T2	55.10 ⁹ /l	19.5 fl	Yes	10	E11841K
3230	26.10 ⁹ /l	ND	Yes	9	E11841K
4305	4.10 ⁹ /l	ND	Small	5	no
C212	23.10 ⁹ /l	16.4 fl	None	4	no

Note: ND, not done; mpv, medium platelet volume.

concentration: 0.4 M instead of the usually used 0.8 M (see Table II).

We analysed seven affected individuals from four unrelated families. The patients were chosen according to conventionally used diagnostic criteria: platelet count, platelet size and the presence of granulocyte inclusions (May-Grünwald-Giemsa staining; see Table I). Five patients were already fully sequenced and we had found known mutations in three patients within this group, there were two patients without mutations from the whole group. We used as a control human DNA without mutation within any of 40 MYH9.

It is relevant to watch the amount of PCR products, because it reflects in the intensity of the fluorescence signal.

The graphs of control were characterized by narrow melting transitions. The mutated samples showed either a broad melting transition or melting

domains (see Figure 1). Results were also visualized as melting peaks (see Figure 3) and difference curves—mutated samples have either a distinctive temperature shoulder or two peaks in comparison with a control (see Figure 2).

The suspected presence of mutations in the samples was confirmed by direct sequencing. The mutations were not detected in all samples identified by HRMA. We analysed 280 PCR products, 41 samples were marked as different from the control. After sequencing of these samples we found five mutations (see Table I).

Discussion

The MYH9 gene comprises 40 exons. In view of this fact, mutation analysis of all MYH9 exons by direct sequencing is tedious. High-resolution melting analysis (HRMA) is an efficient and rapid technique

Table II. Primers used in PCR amplification of MYH9 exons for HRMA and sequencing.

Exon	Forward	Reverse	Size	Temperature
1	CCACCTCGGAGCCCTCAGAC	TGATCTTGTGTGGCTGACGTAGTTG	462 bp	62°C
2	AATGAGGCCCCAGGTGAAGATTCA	TCCTTTGAAGCCGACAGATATTTTGC	304 bp	62°C
3	AGCTCTTTGGGAGCAAGGTG	CAAGAATGAGAACAGACTGGGG	157 bp	62°C
4	GGGAAGGGACAGAGGTCAAG	ATCATCCCACCAAGGCCAAG	215 bp	66°C
5	GACATGCTGACACGGCTCTG	AAAGGCAGCATGAGCCAAAG	267 bp	62°C
6	TCCTCTAGCTCCCCATGTCAGG	TACAGAGGTTCATGCCTCCCC	182 bp	66°C
7	TGAGGAAAGTGGAGGGCTTG	GGTCCAATTCTGGCAAGAGG	226 bp	62°C
8	GCCTCCACTTTCAGCACCTC	TGGGTACCAAGCCTTCCTCTG	251 bp	62°C
9	TTCCCTCCTGAGCAATCCATG	GGAATCACCATGACCCATGTCTG	217 bp	62°C
10	GCAGAGGGACTTATTCTCTTGGG	AACAGCCTCAACTGTGCTGC	288 bp	62°C
11	CTGGGGCATAGGGTATGAGG	GGATAAGGCAACCAACAGGC	284 bp	62°C
12	GAAGGGAAAAGCCAGAGGCAGG	CCTCTTTAGTGCAGGGTTGGCG	276 bp	62°C
13	GGCTTTGGCTTCTTGAAGGG	TCGACTCCACCTCTCCTGTG	305 bp	62°C
14	TGAGCACACATGTCCCCAG	GAGGTGGGAAGATGACCAGC	232 bp	62°C
15	CTTTTCCTGTCCGACGTGTG	TGCTTTTGCTGGGGAGACAG	377 bp	62°C
16	GGGTTCCTGACTATTCTCCG	GACTCACTGCACGCACAGC	249 bp	62°C
17	CATGTGGAATCGAGGCAATG	GGCACTCCCCAGACAAGG	183 bp	62°C
18	CCTTTCATGGAGCTGTGGC	GCTAAGTGCCCTTTGGCAAC	294 bp	62°C
19	GCCAGGTATGTATGGTGGTGTGCA	CAGGACTGTAGGTGCGGTCTGCT	236 bp	62°C
20	GTGGCAGCACCAGGCAGGTG	AGAGGCGGGCATCTTCCAGC	238 bp	63°C
21*	CAGCCTCCTTGACCCCTAATTCC	TGGCGTCCGTCTCTTGAGGA	388 bp	62°C
22	GGACCTTGCTGCCTTCACC	ACCACACTCTCCCATCCACG	270 bp	62°C
23	TCCATTTCAGCCCCAGATTTC	GAGAAGGCCTCGGTGTTCC	321 bp	62°C
24	GGAGACAGAACCCATGGCAC	GAAGTAGGGCCAGCAGCAAG	298 bp	66°C
25	TCGTCTCCTTGAGAGGTGAAAC	GGGTCCATGTCTCCAGGCC	341 bp	62°C
26	CTCGCTCCAGCATCCCC	TGCTCTGCAGGACTGGTTTG	277 bp	62°C
27	TGATGATAGACCAGCCAGCC	CCACAACCTGTCTAGGGC	329 bp	66°C
28	CCTAAAGGAGATGAGGTGGGG	CACAGAGGCCTTTCTGGAGG	233 bp	62°C
29	TGCAGTGCCCAAGGCCAGTGC	CCTCTCCTCAAGGGTGTGGGG	307 bp	66°C
30	ACCTGAGCAGGTGCCATC	GCCCTTTGCTTTGGACTCAG	367 bp	62°C
31	ACACCGACCCTCTGTGATGACCC	CTGCTGGGGGCCGTAGCTCT	329 bp	62°C
32	CACAGACTCCGGGTGCG	AGCCTGCGTGAAGCCAAG	347 bp	62°C
33	ATATGTAGTTGGCTCAGTCGGGTGC	GGTCTCCAGTGCGGTCCAGCT	270 bp	56°C
34*	AGCTGAAAGCCCCACGCTGC	CCCTGTTCGGCAGGTGACCC	283 bp	62°C
35-6	GGGTCCAAGGCCAGCTCTGC	TGGTCTTGTGGGGCTGTGGC	418 bp	66°C
37*	GGCTCAGGAGACAGAGAGCTGG	CTGCTGCCACCTTCTCTG	39 bp	62°C
38	TCCTGGTTAGGGCTTGTGG	CTGTCACCCCATCTGCTGC	243 bp	66°C
39*	TGGTGACATTGCTGCTTGTCTG	CGCCACAGAGCCCTAACCG	320 bp	62°C
40	GGAAGGGAGGCTGTGGTGTCT	ATGTGTGGGCTGTGCTGTGGC	149 bp	63°C

Note: *0.4 M DMSO final concentration, other exons 0.8 M DMSO.

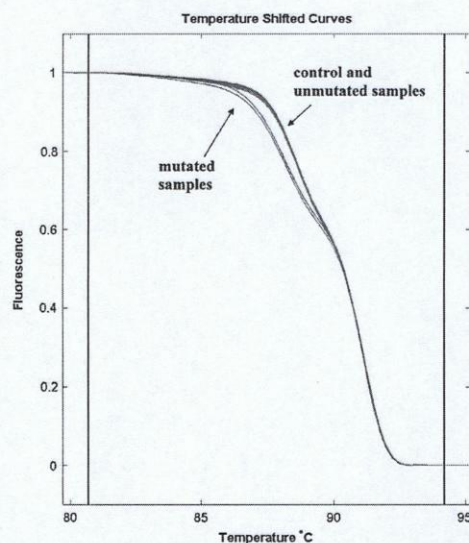


Figure 1. High-resolution melting curves of mutated samples compared with a control. Mutated samples (R1165C) have different melting transition from a control and PCR products marked as not mutated (the graph for the E11841K mutation was very similar).

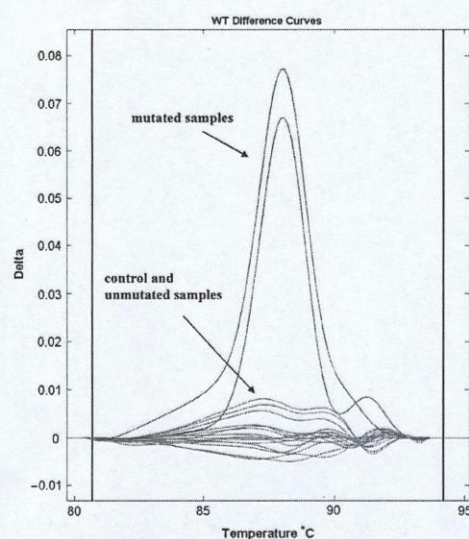


Figure 2. Difference plots of mutated PCR products (R1165C) in comparison with a control and unmutated samples. PCR products marked as different from control have a distinctive peak (the curve for the E11841K mutation showed almost the same course).

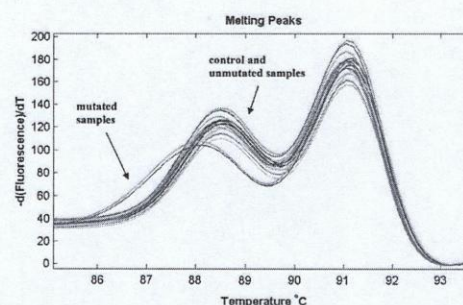


Figure 3. Derivative melting curves of PCR products with mutation (R1165C) in comparison with a control. Mutated PCR products have a lower shifted peak, whereas unmutated PCR products have the same curve-course (the curve for the E11841K mutation was very similar).

capable of detecting large sequence aberrations in a few minutes. On the other hand, we have to take into account a false positivity, which reached 12.9% from all analysed samples (280 PCR products) in our case.

The false positivity can be caused by mutations in introns, because we used primers that are about 30 nucleotides from the exons. But in fact, we are able to notice the distance approximately 10 nucleotides from exons at sequencing. It means that insignificant mutations or polymorphisms further than circa 10 nucleotides from the exon can be marked as a mutation. Using primers that are very near the exons for HRMA could solve this problem. But then the same samples could not be used after HRMA for sequencing, which is also possible.

Another reason for the false positivity appearance can be the influence of DNA adding. The master mix for PCR for each exon is the same. The only compound added separately was the DNA. As HRMA is a very sensitive method, the difference in the amount and purity of the template could cause the false positivity. This can be seen as wide differences among samples in raw data at the beginning of the melting curves.

It is also important how the position of temperature borders is set. This determines the interval of counted temperatures and melting curves. The difference is also in the sensitivity, which can be chosen between normal and high. We had nine samples of a control and according to the sensitivity and temperature borders we saw a small different in the results, even among controls. Therefore, the same set up should be always used for a particular exon.

As to HRMA implementation, LC Green plus dye can be added before or after performing PCR. Both techniques are possible. If the dye is added before PCR, some problems with the PCR products can occur.

We are aware there are other methods for mutational screening, such as DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography). We consider HRMA to be an easier method for mutational screening than DHPLC, because no special buffers and columns are needed. Only a dye (LC Green plus) and a mineral oil are required. HRMA just needs optimization of PCR conditions, whereas for DHPLC primers temperatures for column elution have to be optimized extra. Therefore, we think that HRM analysis is a more convenient way for MYH9 mutational screening.

We analysed using HRMA a group of seven patients and found two known mutations in five patients. These involved two missense mutations of R1165C caused by a C-to-T transition and of E1841K caused by G-to-A transition (OMIM 160075, www.ncbi.nlm.nih.gov). Thus, from all the 280 PCR products we detected mutations only in five marked by HRMA as positive and 36 PCR fragments marked as different from the control were without mutations. Although there is false positivity, HRMA saved us more than 85% of redundant sequencing.

Acknowledgment

This study was supported by a grant from IGA MH CR (grant no. 8762-3/2006).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Simons M, Wang M, McBride OW, Kawamoto S, Yamakawa K, Gdula D, Adelstein RS, Weir L. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* 1991;69:530-539.
2. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savage J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Barker DF, et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin Anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-Like Syndromes. *Am J Hum Genet* 2001;69:1033-1045.
3. Hegglin R. Gleichzeitige konstitutionelle veränderungen an Neutrophilen und thrombocyten. *Helv Med Acta* 1945; 12:439-440.
4. May R. Leukozyteneinschlusse. *Deut Arch Klin Med* 1909;96:1-6.
5. Mhawech P, Saleem A. Inherited giant platelet disorders. Classification and literature review. *Am J Clin Pathol* 2000; 113:176-190.
6. Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly and Fechtner and Sebastian syndromes, May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 2000;26:103-105.
7. Kelley MJ, Jawien W, Ortel TL, Korczak JF. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain, in May-Hegglin anomaly. *Nat Genet* 2000;26:108-110.

Nature of frequent deletions in *CEBPA*. Fuchs O, Kostecka A, Provaznikova D, Krasna B, Brezinova J, Filkukova J, Kotlin R, Kouba M, Kobylka P, Neuwirtova R, Jonasova A, Caniga M, Schwarz J, Markova J, Maaloufova J, Sponerova D, Novakova L, Cermak J. *Blood Cells Mol. Diseases* 2009;43:260-263

Blood Cells, Molecules, and Diseases 43 (2009) 260–263

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules, and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcm



Nature of frequent deletions in *CEBPA*

Ota Fuchs^{a,*}, Arnost Kostecka^a, Dana Provaznikova^a, Blazena Krasna^a, Jana Brezinova^a, Jitka Filkukova^a, Roman Kotlin^a, Michal Kouba^a, Petr Kobylka^a, Radana Neuwirtova^b, Anna Jonasova^b, Miroslav Caniga^a, Jiri Schwarz^a, Jana Markova^a, Jacqueline Maaloufova^a, Dana Sponerova^a, Ludmila Novakova^a, Jaroslav Cermak^a

^a Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Cell Physiology, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic
^b General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Submitted 22 June 2009
Available online 3 August 2009

(Communicated by M. Lichtman, M.D.,
2 July 2009)

Keywords:
CEBPA deletions
Direct repeat
Acute myeloid leukemia
Myelodysplastic syndrome
Non-Hodgkin's lymphoma

ABSTRACT

C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein alpha) belongs to the family of leucine zipper transcription factors and is necessary for transcriptional control of granulocyte, adipocyte and hepatocyte differentiation, glucose metabolism and lung development. *C/EBPα* is encoded by an intronless gene. *CEBPA* mutations cause a myeloid differentiation block and were detected in acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients. In this study we identified in 41 individuals from 824 screened individuals (290 AML patients, 382 MDS patients, 56 NHL patients and 96 healthy individuals) a single class of 23 deletions in *CEBPA* gene which involved a direct repeat of at least 2 bp. These mutations are characterised by the loss of one of two same repeats at the ends of deleted sequence. Three most frequent repeats included in these deletions in *CEBPA* gene are CGCGAG (493–498, 865–870), GCCAAGCAGC (508–517, 907–916) and CG (486–487, 885–886), all according to GenBank accession no. NM_004364.2. A mechanism for deletion formation between two repetitive sequences can be recombination events in the repair process. Double-stranded cut in DNA can initiate these recombination events of adjacent DNA sequences.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The CCAAT/enhancer binding protein alpha (*C/EBPα*) is a member of the leucine zipper class of transcription factors that play important roles in hematopoiesis through the control of proliferation and differentiation of myeloid progenitors [1,2]. Members of this class consist of N-terminal transactivation domains (TAD1 and TAD2), a basic region (DBD) able to interact with specific DNA sequences and a C-terminal leucine rich dimerization region (ZIP). *C/EBPα* is a critical tumor suppressor in the hematopoietic system. *CEBPA* mutations (somatic or germ-line), which occur in AML and MDS are involved in abrogation of *C/EBPα* expression and/or function [3–7]. Two types of *CEBPA* mutations are most frequent, frameshift mutations in the N-terminal region and in-frame insertions or deletions in the C-terminal DBD and ZIP regions. Both these *CEBPA* mutation types can occur as mono- or bi-allelic mutations. Relatively favorable prognosis of AML patients, mainly of those with a normal karyotype, is associated with double *CEBPA* mutations (the combination of N- and C-terminal mutation types) and therefore these *CEBPA* mutations gained interest as a prognostic marker [8,9]. In our previous study we analysed the presence of polymorphisms and mutations in the *CEBPA* of patients

with hematologic malignancies [10]. During this study we found the interesting class of 6 various deletions in *CEBPA* gene, which involved a direct repeat of at least 2 bp. These mutations are characterised by the loss of one of two identical repeats at the ends of the deleted sequence. By further analysis of *CEBPA* mutations we found 23 various deletions of this type in the *CEBPA* gene in 43 individuals from 820 persons screened (see Results and discussion for details).

Materials and methods

Genomic DNA, RNA and cDNA preparation

After informed consent patient- or healthy individual-derived bone marrow or peripheral blood mononuclear cells (290 AML, 382 MDS, 56 NHL patients and 96 healthy individuals) were Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) purified and total RNA and genomic DNA were isolated. Complementary DNA was synthesised from total RNA using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

Identification of *CEBPA* mutations

The PCR reaction was carried out using genomic DNA or cDNA and Advantage-GC Genomic Polymerase Mix (Clontech Laboratories,

* Corresponding author. Fax: +420 221977370.
E-mail address: Ota.Fuchs@uhkt.cz (O. Fuchs).

1079-9796/\$ - see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcmd.2009.07.001

Table 1
Deletion types and their numbers in screened individuals.^a

Nucleotide change ^b	Nucleotide change ^c	Amino acid change ^{b,c}	Comment	Repetition (nucleotide position and sequence)	Frequency of mutations ^d
493_864del	1084_1455del	E166_R289del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	493–498 and 865–870 CGCGAG	23
508_906del	1099_1497del	A167_K302del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	508–517 and 907–916 GCCAAGCAGC	21
486_884del	1077_1475del	E163_A295del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	486–487 and 885–886 GG	19
152_520del	743_1111del	L52_A174del	Deletion of TAD1 and partial deletion of TAD2	152–157 and 521–526 CGCTGG	4
232_522del	823_1113del	L78_A174del	Deletion of TAD1 and partial deletion of TAD2	232–238 and 523–529 CTGCGCC	3
260_411del	851_1002del	Q87fsX119	Frameshift and stop in TAD2, deletion of TAD1	254_259 and 406_411 GCCGCG	2
502_900del	1093_1491del	D168_R300del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	502–503 and 901–902 GA	2
18_389del	609_908del	Y7_G130del	Deletion of TAD1 and partial deletion of TAD2	18–22 and 390–394 CTACG	1
912_929del	1503_1520del	Q305_E309del	Deletion in DBD	912_916 and 930_934 GCAGC	1
656_794del	1247_1358del	H219fsX272	Deletion, frameshift and stop in TAD2	654–655 and 793–794 GC	1
512_931del	1103_1522del	Q172_Q311del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	512–516 and 932–936 AGCAG	1
508_819del	1099_1410del	A170_K273del	Deletion of TAD2	508–513 and 820–825 GCCAAG	1
669_1086del	1260_1677del	H224fs_X282	Deletion of DBD and ZIP	666–668 and 1084–1086 CCG	1
721_745del	1312_1336del	L241fsX313	Frameshift in DBD, stop between DBD and ZIP	721–722 and 746–747 CT	1
544_803del	1135_1394del	P183fsX225	Deletion in TAD2, frameshift and stop before DBD	544–547 and 804–807 CAGC	1
44_694del	635_1285del	S16_V232del	Deletion of TAD1 and partial deletion of TAD2	44–45 and 695–696 TG	1
30_402del	621_993del	E10fsX35	Deletion of TAD1, frameshift and STOP in TAD2	30–33 and 403–406 CCCC	1
510_917del	1101_1508del	K171_R306del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	510–512 and 918–920 CAA	1
493_870del	1084_1461del	E166_E290del	Deletion of TAD2 and partial deletion of DBD	493–495 and 871–873 CGC	1
581_775del	1172_1366del	H185_A259del	Deletion of TAD2	581–583 and 776–777 GCG	1
489_680del	1090_1271del	P164_T22del	Deletion of TAD2	489–491 and 681–683 GCC	1
490_779del	1081_1370del	E166fsX223	Deletion of TAD2 and STOP between TAD2 and DBD	490–495 and 780–785 CCCCC	1
483_802del	1074_1393del	E163fsX213	Deletion of TAD2 and STOP between TAD2 and DBD	483–486 and 803–806 GCAG	1

^a 824 screened individuals (290 AML patients, 382 MDS patients and 96 healthy individuals).

^b GenBank accession no. NM_004364.2.

^c GenBank accession no. U_34070.

^d Frequency of mutations = number of individuals carrying one to three or more deletions of these types.

Inc., Mountain View, CA, USA). Two or in some cases four overlapping primer pairs, which cover the entire coding region of human *CEBPA*, were used [11]. In some samples with abnormal sequencing results, an additional pair of PCR primers was exploited (BF, BR) [12]. The positions of the primers complementary to the C/EBPα cDNA sequence (GenBank accession no. U34070) were FPP1 (562–585) 5'-TCGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC-3', RPP1 (1114–1137) 5'-CTGGTAAGGGAAGAGCGCCGCCAG-3', FPP2 (1060–1079) 5'-CCGCTGGTGATCAAGCAGGA-3', RPP2 (1739–1762) 5'-CAGCGCTCGGCAAGCCTCGAGAT-3', F1 (563–582) 5'-CGCCATGCCGGGAGAACTCTAAC-3', R1 (850–869) 5'-GCCTTGGCCTTCTCTGCTG-3', F2 (829–848) 5'-GACCTGTCCAGCACAGCCG-3', R2 (1122–1141) 5'-CGCGCTGTAAGGGAAGAGG-3', F3 (1084–1103) 5'-CGCGAGGAGGATGAAGCCAA-3', R3 (1426–1450) 5'-CCCGTACTCGTTGCTGT-TCTTGTG-3', F4 (1404–1423) 5'-GGGCAAGCCAAAGAGTCGG-3', R4 (1651–1670) 5'-CCTCAGCGCAGTTGCCAT-3', BF (816–835) 5'-CGAGTTCTGCGCCAGCTGT-3', BR (1119–1138) 5'-GCTGTAAGGGAAGAGGCCG-3'. PCR was performed in 25 μL reaction containing 40 mmol/L Tris-HCl (pH 9.3 at 25 °C), 85 mmol/L KOAc, 5% DMSO, 0.1% DMSO, 1.1 mmol/L Mg(OAc)₂, 1 mol/L GC-Melt (Clontech Laboratories, Inc.), 0.2 mmol/L each of dATP, dTTP, dGTP, and dTTP, 0.2 μmol/L each of forward and reverse primer, 1.7 units of *Tth* DNA Polymerase from Advantage® - GC Genomic Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.) and 50 ng genomic DNA. Amplification was performed with an initial heat denaturation step for 4 min at 94 °C followed by 39 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 1 min of annealing at 65 °C (FPP1-RPP1 and F1-R1, 64 °C for FPP2-RPP2, 63 °C for F2-R2, 60 °C for F3-R3, F4-R4 and BF-BR) and 100 s of elongation at 72 °C in the Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA). PCR products were electrophoresed on agarose gels, electroeluted from the pieces of gel, purified and sequenced using BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) in both directions on ABI 3100 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems) or similarly using Genome Lab DTCS-Quick Start Kit and CEQ 8000 genetic analysis

system (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). GenBank accession no. NM_004364.2 was used for evaluation of obtained sequences. Some earlier papers about *CEBPA* mutations used GenBank accession no. U_34070 and therefore our results are described according to both GenBank Accessions No. NM_004364.2 and No. U_34070.

Results and discussion

We detected twenty-three various deletions with the presence of two direct repeats in *CEBPA* (Table 1) in 43 individuals from 820 screened individuals (290 AML patients, 382 MDS patients, 56 NHL patients and 96 healthy individuals). Some of screened individuals carry two, three or more various deletions of this type (Table 2). These mutations are characterised by the loss of one from two same repeats at the ends of deleted sequence. Three most frequent repeats included in these deletions in *CEBPA* gene are CGCGAG (493–498, 865–870), GCCAAGCAGC (508–517, 907–916) and GG (486–487, 885–886), all according to GenBank accession no. NM_004364.2.

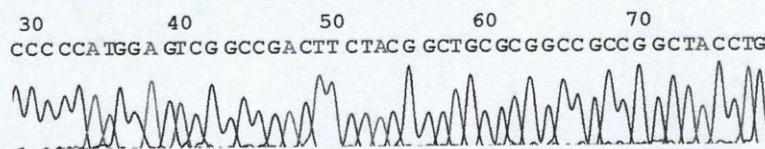
In Fig. 1, an example of these deletions is shown (patient No. 15 901 with MDS). This deletion 18_389del according to GenBank accession

Table 2
Number of individuals with or without deletions with repetitions.

Diagnosis	Number of screened individuals	Number of individuals carrying one deletion	Number of individuals carrying two deletions	Number of individuals carrying three deletions	Number of individuals carrying more than three deletions
AML	290	7	6	7	1
MDS	382	7	5	4	1
Non-Hodgkin's lymphoma	56	1	0	0	0
Healthy individuals	96	1	0	2	1

MDS patient 15901, age 76, female, unknown cytogenetics

sequence AD710, 18 (51)_389del, Y7_G130del, repetition 18–22 (51–55) and 390–394 CTACG
Sequence numbering is according to GenBank number NM004364.2.



This deletion means the loss of TAD1 and the partial deletion of TAD2.

```
WT 01 atggagtcgg ccgacttcta cg
DEL 01 atggagtcgg ccgactt--- --

390 WT c tacggctcgg cggccgccc ctacctggac
390 DEL c tacggctcgg cggccgccc ctacctggac
```

```
MESADFYEA PRPMSSHLQ SPPHAPSSAA FGFRGAGPA QPPAPPAPE PLGGICEHET SIDISAYIDP
AAFNDEFLEAD LFQHSRQKEK AKAAVGPTGG GGGGDFDYPG APAGPGGAVM PGGAHGPPPG YGCAAAAGYLD
GRLEPLYERV GAPALRPLVI KQEPREDEEA KQLALAGLFP YQPPPPPPPS HPHPHPPPAH LAAPHLGFQI
AHCGQTTMHL QPGHPTPPT PVPSHPAPA LGAGLPGPG SALKGLGAH PDLRASGGSG AGKAKKSVDK
NSNEYVRRE RNNIAVRKSR DKAKQNVET QQKVLLETSO NDRLKRREVEQ LSRELDTLRG IFRQLPESSL
VKAMGNCA
```

Fig. 1. An example of detection of deletion in *CEBPA*, which involves a direct repeat. Sequencing chromatogram of patient 15901 with MDS indicating the presence of deletion at cDNA nucleotide position 18 (51)_389del, repetition 18–22 (51–55) and 390–394 CTACG (GenBank accession no. NM_004364.2) is presented. Amino acid sequence of the mutated (Y7_G130del) protein is compared to wild type sequence (GenBank accession no. NM_004364.2).

no. NM_004364.2 (Table 1) causes the deletion of TAD1 and the partial deletion of TAD2 and the loss of transactivating potential of mutated C/EBP α in the transcription of target genes involved in granulocyte differentiation. The ability of this mutant to arrest cell proliferation will be possibly lacked through diminished E2F binding, as suggested by structural analysis.

We detected deletions with the presence of two direct repeats in *CEBPA* not only in AML and high-risk MDS, but also in four of 96 healthy individuals (Table 2). Therefore, it is possible that intronless *CEBPA* may be more susceptible to genotoxic stress than other genes containing introns [13].

A mechanism for deletion formation between two repetitive sequences can be recombination events in the repair process, for example an unequal crossover. Double-stranded cut in DNA can initiate these recombination events of adjacent DNA sequences [14,15]. Rearrangements between repetitive sequences elements are the cause of genomic instability in both prokaryotes and eukaryotes. A large subset of mutations that inactivate genes are deletion events between two short regions of sequence homology in bacteria, yeast and in humans [16,17]. Direct repeats of between 2 bp and 10 bp were found in the immediate vicinity of many deletions analysed. Direct repeats are a feature of a number of recombination, replication or repair-based models of deletion mutagenesis. In humans, deletion or duplication between repeated DNA sequences contribute to human genetic diseases, both of nuclear genes and in the mitochondrial genome [18–23].

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (VZ UHKT 00023736).

References

- [1] A.D. Friedman, Transcriptional control of granulocyte and monocyte development, *Oncogene* 26 (2007) 6816–6828.
- [2] A.D. Friedman, C/EBP α induces PU.1 and interacts with AP-1 and NF- κ B to regulate myeloid development, *Blood Cells Mol. Diseases* 39 (2007) 340–343.
- [3] A.F. Gombart, W.-K. Hofmann, S. Kawano, et al., Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein α in myelodysplastic syndromes and myeloid leukemias, *Blood* 99 (2002) 1332–1340.
- [4] O. Fuchs, Growth-inhibiting activity of transcription factor C/EBP α , its role in haematopoiesis and its tumour suppressor or oncogenic properties in leukaemias, *Folia Biol. (Praha)* 53 (2007) 97–108.
- [5] T. Pabst, M. Eyholzer, S. Haefliger, et al., Somatic *CEBPA* mutations are a frequent second event in families with germline *CEBPA* mutations and familial acute myeloid leukemia, *J. Clin. Oncol.* 26 (2008) 5088–5093.
- [6] M.B. Schuster, B.T. Porse, C/EBP α in leukemogenesis: identity and origin of the leukemia-initiating cell, *BioFactors* 35 (2009) 227–231.
- [7] S. Koschmieder, B. Halmos, E. Levantini, D.G. Tenen, Dysregulation of the C/EBP α differentiation pathway in human cancer, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 619–628.
- [8] B.J. Wouters, B. Löwenberg, C.A.J. Erpelinck-Verschueren, et al., Double *CEBPA* mutations, but not single *CEBPA* mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome, *Blood* 113 (2009) 3088–3091.
- [9] T. Pabst, M. Eyholzer, J. Fos, B.U. Mueller, Heterogeneity within AML with *CEBPA* mutations; only *CEBPA* double mutations, but not single *CEBPA* mutations are associated with favourable prognosis, *Br. J. Cancer* 100 (2009) 1343–1346.
- [10] O. Fuchs, D. Provaznikova, M. Kocova, et al., *CEBPA* polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma, *Blood Cells Mol. Diseases* 40 (2008) 401–405.
- [11] T. Pabst, B.U. Mueller, P. Zhang, et al., Dominant negative mutations of *CEBPA*, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α) in acute myeloid leukaemia, *Nat. Genet.* 27 (2001) 263–270.
- [12] D.-C. Liang, L.-Y. Shih, C.-F. Juany, et al., *CEBPA* mutations in childhood acute myeloid leukemia, *Leukemia* 19 (2005) 410–414.
- [13] F.V. Rassol, T.J. Gaymes, N. Omidvar, et al., Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with the progression in myeloid leukemia? *Cancer Res.* 67 (2007) 8762–8771.
- [14] J.W. Szostak, R.J. Orr-Weaver, R.J. Rothstein, F.W. Stahl, The double-strand-break repair model for recombination, *Cell* 33 (1983) 25–35.
- [15] J. Fishman-Lobell, N. Rudin, J.S. Haber, Two alternative pathways of double-strand break repair that are kinetically separable and independently modulated, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 1292–1303.
- [16] J. Thacker, J. Chalk, A. Ganesh, P. North, A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 6183–6188.
- [17] M. Bzymek, S.T. Lovett, Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8319–8325.
- [18] M. Krawczak, D.N. Cooper, Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment, *Hum. Genet.* 86 (1991) 425–441.
- [19] P. Lestienne, N. Bataillé, Mitochondrial DNA alterations and genetic diseases: a review, *Biomed. Pharmacother.* 48 (1994) 199–214.

- [20] S.S. Abeyasinghe, N. Chuzanova, M. Krawczak, et al., Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: nucleotide composition and recombination-associated motifs, *Human Mutat.* 22 (2003) 229–244.
- [21] N. Chuzanova, S.S. Abeyasinghe, M. Krawczak, D.N. Cooper, Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer II: potential involvement of repetitive sequence elements in secondary structure formation between DNA ends, *Human Mutat.* 22 (2003) 245–251.
- [22] D.C. Samuels, E.A. Schon, P.F. Chinnery, Two direct repeats cause most human mtDNA deletions, *Trends Genet.* 20 (2004) 393–398.
- [23] K.J. Krishnan, A.K. Reeve, D.C. Samuels, et al., What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40 (2008) 275–279.

Antiproliferative and proapoptotic effects of proteasome inhibitors and their combination with histone deacetylase inhibitors on leukemia cells. Fuchs O, Provaznikova D, Marinov I, Kuzelova K, Spicka I. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009;9:62-77

62

Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets, 2009, 9, 62-77

Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Proteasome Inhibitors and their Combination with Histone Deacetylase Inhibitors on Leukemia Cells

Ota Fuchs^{1,2,*}, Dana Provaznikova^{1,2}, Iuri Marinov¹, Katerina Kuzelova¹, Ivan Spicka³

¹Institute of Hematology and Blood Transfusion, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic, ²Center of Experimental Hematology with Institute of Pathophysiology, First Medical Faculty, Charles University, Prague, ³General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract: New chemotherapeutic agents are still required to further optimise treatment of leukemia patients. Proteasome inhibition by bortezomib, PR-171 (carfilzomib) and NPI-0052 (salinosporamide A) has been successfully used for the treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma and is considered also as novel treatment strategy in leukemia. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 induces synergistic anti-multiple myeloma activity both *in vitro* using multiple myeloma cells and *in vivo* in a human plasmacytoma xenograft mouse model. Cell death resulting from proteasome inhibition requires caspase activation and increased levels of reactive oxygen species. While bortezomib induces several caspases, NPI-0052 activates predominantly caspase-8-dependent pathway. We studied the effect of bortezomib (10 nM) on DNA synthesis and apoptosis in human acute myeloid cell lines KASUMI-1, ML-1, ML-2 and CTV-1 cells. Bortezomib was potent inhibitor of DNA synthesis in all four types of leukemia cells and induced apoptosis in KASUMI-1, ML-2 and CTV-1 cells but not in ML-1 cells. Other research groups showed that histone deacetylase inhibitors (valproic acid or benzamide derivative MS-275) in combination with NPI-0052 or PR-171 induced greater levels of acute leukemia cell death than in combination with bortezomib. Proteasome inhibition as monotherapy and its combination with many conventional therapies as novel treatment strategies in leukemia are promising. Malignant cells are more sensitive to this treatment than normal hematopoietic cells.

Key Words: Proteasome, proteasome inhibitors, histone deacetylase inhibitors, leukemia, apoptosis.

INTRODUCTION

Ubiquitin-dependent proteolysis regulates the stability and function of key regulatory proteins that regulate the cell cycle, gene transcription, receptor endocytosis, intracellular trafficking, response to extracellular signal, signal transduction, antigen presentation, and control cell growth. Ubiquitin is a highly conserved protein of 76 amino acids that is covalently attached to substrate proteins through an energy-dependent enzymatic mechanism and polyubiquitinated proteins are degraded by a multicompartimentalized protease called the 26S proteasome [1-4]. For the discovery of ubiquitin and its function in non-lysosomal pathway of protein degradation, the 2004 Nobel Prize in Chemistry was awarded to Drs. Avram Herskko, Aaron Ciechanover and Irwin Rose [5-8].

Schematic representation of the ubiquitin conjugation (ubiquitination, also referred to as ubiquitylation or ubiquitylation) and of the ubiquitin-proteasome system is shown in Fig. (1). Ubiquitination is a posttranslational modification of proteins. Ubiquitin is activated in an ATP-dependent manner by a ubiquitin-activating enzyme known as an enzyme-1 (E1). Subsequently, ubiquitin is transferred to a ubiquitin-conjugating enzyme-2 (E2). E2, with the help of a ubiquitin-protein ligase (E3) and in some cases in the

presence of an accessory factor (E4) [9], specifically attaches ubiquitin to the protein substrate. Only ten E1 enzymes, but about 100 E2 enzymes and 1000 E3 enzymes exist in human cells [10]. E3 ubiquitin ligases determine the specificity of protein substrates and are targets for pharmaceutical intervention. There are two major types of E3 ligases: the RING (really interesting new gene) domain-containing E3s and the Hect (homologous to E6-associated protein carboxyl terminus) domain-containing E3s. RING E3s bring the E2 enzyme in close proximity of the target protein, allowing the E2 to directly ubiquitinate the substrate. However, in the case of Hect E3s, ubiquitin is first transferred onto a conserved cysteine in the Hect domain. Consequently, Hect E3 enzyme ubiquitinates the substrate protein. Polyubiquitin chain formation results from a linkage between the C terminus of one ubiquitin and a lysine side chain in another. Generated polyubiquitin chain (at least four attached ubiquitins) functions as signal for the subsequent degradation of protein substrates in the 26S proteasome.

Eukaryotic proteasomes, model of a barrel-like structure in Fig. (2), consist of two outer α -rings and of two inner β -rings, each assembled from seven similar, but distinct, subunits. 19S regulatory complex caps both ends of the 20S proteasome to form 26S proteasome. Each 19S regulatory complex contains at least seventeen different subunits and is assembled from two main subcomplexes-a base that contains six ATPases (Rpt) plus three non-ATPase subunits (Rpn), and a lid subcomplex that sits on top of the base and consist at least eight non-ATPase regulatory particles (Rpn). 19S

*Address correspondence to this author at the Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Cell Physiology, U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic; Tel: +420 221977313; Fax: +420 221977370; E-mail: Ota.Fuchs@uhkt.cz

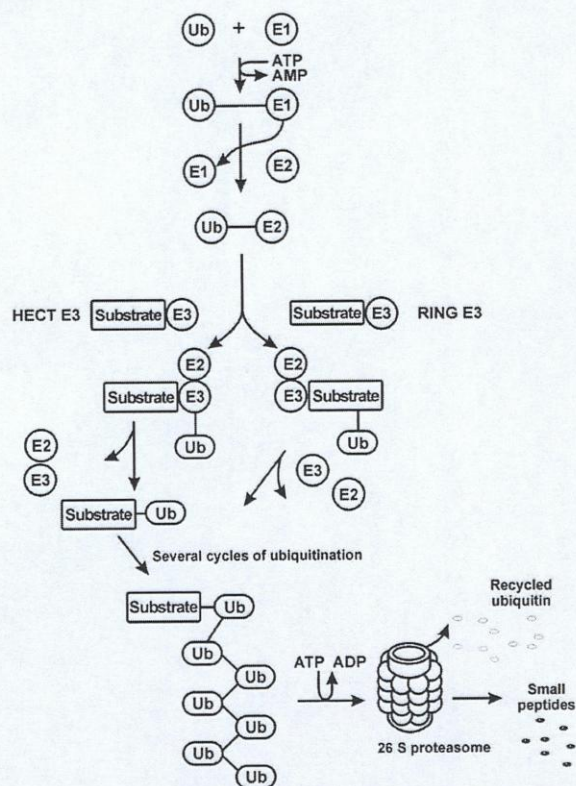


Fig. (1). The ubiquitin-proteasome system. Attachment of ubiquitin to the target protein requires three enzymatic steps. Ubiquitin-activating enzymes activate ubiquitin by forming a high energy thiol ester bond between an E1 active site-located cysteine residue and the C-terminal glycine residue of ubiquitin. This reaction requires energy provided by the hydrolysis of ATP and forms an activated thiol ester bond to ubiquitin-conjugating enzymes that serve as carrier proteins. Ubiquitin-protein ligases catalyze the covalent attachment of ubiquitin to the target protein by the formation of isopeptide bonds. Multiple cycles of ubiquitination finally result in the synthesis and attachment of polyubiquitin chains that serve as a recognition signal for the degradation of the target protein by the 26S proteasome.

regulatory complex recognizes the polyubiquitin proteolytic signal and unfolds substrates [4]. The 19S regulatory complex also takes a role in recycling ubiquitin as it contains deubiquitinating enzymes. The 20S core exhibits three enzymatic activities (chymotrypsin-like, trypsin-like, and peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing also named caspase-like) in the inner β -rings. Many proteins degraded by proteasome are implicated in important cell processes: cell-cycle-regulatory proteins (cyclins A,B,C,D and E, inhibitors of cyclin-dependent kinases -proteins p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1}, the tumor suppressor p53, inhibitor of NF- κ B- protein I κ B, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).

PROTEASOME INHIBITORS

Proteasomes belong to proteolytic enzymes called threonine proteases. Proteasome inhibitors were first synthesized

as tools to probe the function and proteolytic activity specificity of the proteasome [11,12]. Most of the proteasome inhibitors address the chymotryptic activity of the 20S proteasome core *via* adduct formation with N-terminal threonine hydroxyl group as part of the catalytically active center. Studies with proteasome inhibitors treated leukemia cell lines showed that proteasome inhibitors were good inducers of leukemia cells apoptosis [13,14]. Transformed cells are much more sensitive to proteasome inhibition than normal cells [15,16]. Thus, the possibility that proteasome inhibitors could be drug candidates appeared as a new hope for cancer therapy. Several classes of proteasome inhibitors were developed and several proteasome inhibitors are shown in Fig. (3). There are six major classes of proteasome inhibitors: peptide aldehydes, peptide semicarbazones, peptide vinyl sulfones, peptide boronates, peptide epoxyketones (epoxomycin and eponomycin) and β -lactones (lactacystin and its

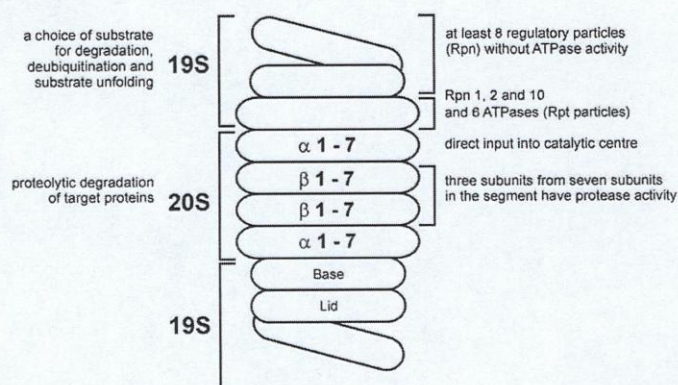


Fig. (2). The structure of the 26S proteasome. The 26S proteasome consists of the 20S catalytic core complex and two 19S regulatory complexes capping the 20S complex at both ends. The 20S complex is composed of four axially stacked rings. Each of the outer rings consists of seven polypeptide α subunits that serve as the gates through which proteasome substrates enter, whereas each of the two inner rings is formed by seven proteolytic β subunits, and only three of them, $\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 5$, are proteolytically active and harbor proteolytic sites that face the central cavity of the 20S complex. The 19S complex consists of the base and lid subcomplex. The base subcomplex contains six non-redundant ATPases. The lid subcomplex contains at least eight subunits including deubiquitinating enzymes and receptors for ubiquitinated proteins. The polyubiquitinated target protein enters the 19S regulatory complex and is recognized, deubiquitinated, unfolded, and translocated into the central cavity of the 20S catalytic core complex, where it is degraded by different hydrolytic activities. Ubiquitin is recycled by the ubiquitin carboxy terminal hydrolase. Peptides as a product of degradation are released from the 26S proteasome by diffusion and are used for major histocompatibility class I antigen presentation or are further degraded to single amino acids by cytosolic peptidases.

derivatives), based on the pharmacophore that reacts with the threonine residue in the active site of the proteasome. In leukemia, three classes of proteasome inhibitors entered clinical trials (peptide boronates /bortezomib/, β -lactones /NPI-0052/ and epoxomycin derivatives /PR-171/). Toxicity profiles of other three classes of proteasome inhibitors (peptide alde-

hydes, peptide semicarbazones and peptide vinyl sulfones) prevent their use in clinical trials.

Resistance to apoptosis and enhanced proliferation is characteristic feature of cancer cells. Proteasome inhibitors induce cell cycle arrest by interfering with timely degradation of cyclins and cyclin-dependent kinases inhibitors. Pro-

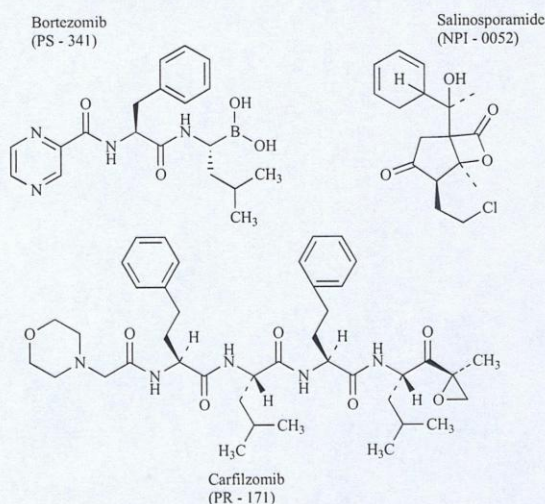


Fig. (3). Chemical structures of several selected proteasome inhibitors.

teasome inhibitors function as apoptosis inducers by inhibition of transcription factor NF- κ B and by endoplasmic reticulum stress and subsequent generation of reactive oxygen species. Proteasome inhibitors stabilize proapoptotic proteins, such as p53, Bax, Bik and Bim while reduce levels of some antiapoptotic proteins, such as Bcl2.

The first developed proteasome inhibitors were peptide aldehydes, which mimic a protein substrate [17-19]. The peptide aldehydes form a reversible covalent hemiacetal intermediate between the aldehyde group of the inhibitor and the hydroxyl group of the amino terminal threonine. MG115 (N-benzoyloxycarbonyl(Z)-1-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal), MG132 (N-benzoyloxycarbonyl (Z)-Leu-Leu-leucinal) and PSI (N-benzoyloxycarbonyl (Z) -Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-leucinal) are members of this group of proteasome inhibitors. However, many peptide aldehydes, for example MG132 and others, cause significant neurotoxicity and therefore they were not used in clinical trials.

Bortezomib

Boronate inhibitors of the proteasome are more potent than structurally similar peptide aldehydes [20]. Bortezomib (VELCADE, formerly known as PS-341, pyrazinylcarbonyl-Phe-Leu-boronate) inhibits proteasome by binding reversibly to the chymotrypsin-like site in the 20S core of the proteasome [21]. Bortezomib is the first proteasome inhibitor approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma (MM) and some forms of non-Hodgkin's lymphoma, mantle cell lymphoma [22-32]. Cellular mechanisms responsible for the clinical efficacy of bortezomib include inhibition of tumor cell adhesion to stroma and disruption cytokine-dependent survival pathways, in part through suppression of the transcription nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity, inhibition of angiogenesis, induction of aggresome (aggregates of ubiquitin-conjugated proteins) formation, en-

doplasmic reticulum stress, and the unfolded protein response [33-39].

Bortezomib represses NF- κ B function by stabilizing I κ B, which binds NF- κ B and prevents its nuclear translocation [40]. The association of NF- κ B activation with tumor promotion, progression and metastasis is well documented and has been demonstrated in several mouse models [41,42]. NF- κ B plays a role in angiogenesis, cell invasion, oncogenesis, proliferation, and suppression of apoptosis. Moreover, NF- κ B inhibition induces chemosensitization and radiation sensitivity because many chemotherapeutic agents, and ionizing radiation activate antiapoptotic NF- κ B functions [43-47].

Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by disruption of the NF- κ B and the transcription factor Sp1, leading in turn to downregulation of DNA methyltransferase *DNMT1* gene transcription [48]. DNMT1 plays a critical housekeeping role in maintaining established patterns of DNA methylation in dividing cells [49]. DNA methyltransferases are overexpressed in AML and solid tumors and play an important role in the development and maintenance of the neoplastic phenotype [50]. DNA hypomethylation has a significant antitumor activity because it causes reactivation of tumor suppressor genes in leukemia cells and restores normal patterns of cell proliferation, differentiation, and apoptosis [51].

Bortezomib-mediated proteasome inhibition affect multiple signaling pathways, including cell cycle, growth arrest, stress response, microenvironment and apoptosis. Disruption of multiple cellular signaling by bortezomib initiates and maintains an active cell death pathway and causes apoptosis as we show in Fig. (4).

Bortezomib-mediated programmed cell death is connected with JNK (c-Jun-NH₂ terminal kinase) induction, generation of reactive oxygen species, transmembrane mito-

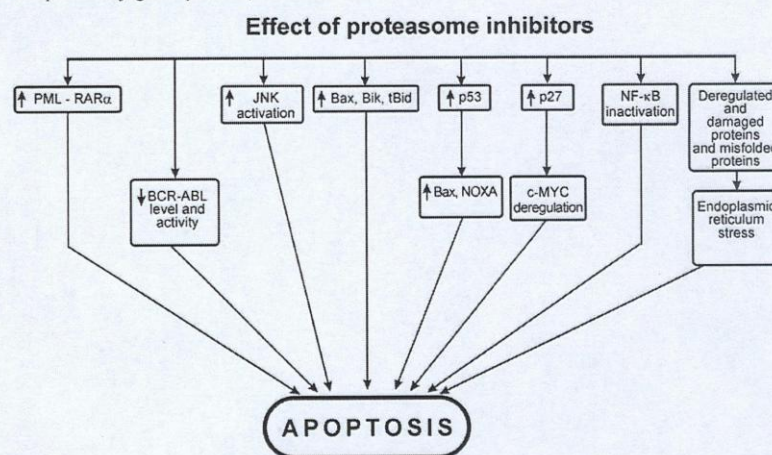


Fig. (4). Molecular targets of proteasome inhibitors in the process of apoptosis induction.

chondrial potential gradient collapse, release of proapoptotic mitochondrial proteins, such as cytochrome c, and activation of intrinsic, caspase-9-mediated and extrinsic, caspase-8-mediated apoptosis. Bortezomib responses are also linked to the upregulation of the proapoptotic Bcl-2 protein family member NOXA and this effect is independent of constitutive activity of the phosphoinositide 3-kinase/AKT (protein kinase B) and NF- κ B pathways.

Bortezomib works best in multiple myeloma and mantle cell lymphoma with overexpression of cyclin D isoforms. Clinical studies with bortezomib in solid tumors are disappointing, but are also better in cyclin D-dependent cancer models [52]. Activation of NF- κ B has been noted in many tumor types, however only rarely has this been linked to an underlying genetic mutation [53]. Activation of the non-canonical NF- κ B pathway in multiple myeloma is important for the highest response rate to bortezomib. Sometimes, bortezomib may paradoxically activate NF- κ B and in these cases, bortezomib is the inefficient drug [54]. In addition to primary resistance, secondary or acquired resistance was observed and was ascribed to efflux through P-glycoprotein [55]. Furthermore, a number of toxicities including painful peripheral neuropathy, thrombocytopenia, anemia, fatigue, diarrhea, and neutropenia have restricted dosing schedule of bortezomib [56-59]. Therefore, clinical evaluation of additional proteasome inhibitors is warranted.

Second-Generation Irreversible Proteasome Inhibitors

Two second-generation irreversible proteasome inhibitors have entered phase I and phase II trials: 1) salinosporamide A (NPI-0052), a natural product derived from the fermentation of the marine Gram-positive actinomycete *Salinospora tropica* and related to lactacystin [60-66] and 2) carfilzomib (PR-171), a modified peptide related to the natural product epoxomicin [67-70].

Schematic representation of the mechanism of action of salinosporamide A is shown in Fig. (5). Inhibition of the chymotrypsin-like, trypsin-like, and caspase-like proteolytic activities of the 20S proteasome in leukemia cells by salinosporamide A (NPI-0052) results in activation of caspase-8. This leads to proapoptotic protein Bid cleavage and to the considerable decrease of mitochondrial transmembrane potential [65]. Mitochondrial membrane permeabilization, release of cytochrome c and activation of caspase-9 follow. Apoptosis proceeds then by activation of effector caspase-3 and consequent DNA fragmentation and increased levels of intracellular reactive oxygen species were detected [65].

Compared with bortezomib, MG-132, N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN), and lactacystin, salinosporamide A was found to be the most potent suppressor of NF- κ B activation [71]. Salinosporamide A (NPI-0052) potentiated the apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha (TNF α), bortezomib, and thalidomide, and this correlated with down-regulation of gene products that mediate cell proliferation, (cyclin D1, cyclooxygenase-2, and c-Myc), cell survival (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, TRAF1, IAP1, IAP2, and survivin),

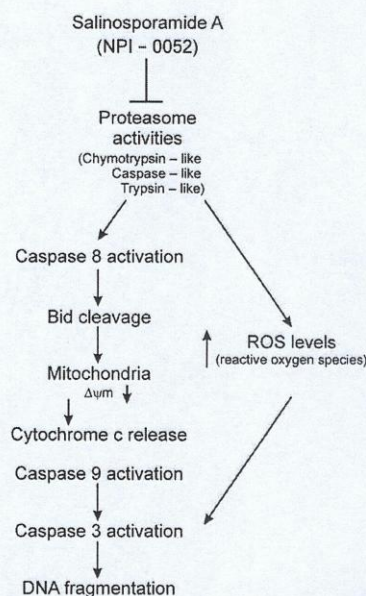


Fig. (5). Schema of the mechanism of inhibition of all three proteasome proteolytic activities (the chymotrypsin-like, caspase-like, and trypsin-like activities) by salinosporamide A (NPI-0052) in leukemia cells. NPI-0052 induces caspase-8, which initiates Bid cleavage and drops of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$). Mitochondrial perturbations lead to the release of cytochrome c from the mitochondria, which then activates the mitochondrial-mediated proapoptotic pathway (activation of caspases-9 and -3 and consequent DNA fragmentation). Parallel pathway of cell death induction by NPI-0052 is connected with reactive oxygen species generation.

invasion (matrix metalloproteinase-9 and ICAM-1), and angiogenesis (vascular endothelial growth factor). Salinosporamide A also suppressed TNF-induced tumor cell invasion and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis. NPI-0052 also inhibited both constitutive and inducible NF- κ B activation. Further studies showed that salinosporamide A inhibited TNF-induced inhibitory subunit of NF- κ B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) degradation, nuclear translocation of p65, and NF- κ B-dependent reporter gene expression but had no effect on $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kinase activation, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylation, or $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ubiquitination. Salinosporamide A enhances apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through suppression of the NF- κ B pathway. NPI-0052 induces apoptosis in multiple myeloma (MM) cells resistant to conventional and bortezomib therapies [71].

NPI-0052 is distinct from bortezomib in its chemical structure, effects on proteasome activities, mechanisms of action, and toxicity profile against normal cells. Moreover, NPI-0052 is orally bioactive. In animal tumor model studies,

NPI-0052 is well tolerated and prolongs survival, with significantly reduced tumor recurrence. Combining NPI-0052 and bortezomib induces synergistic anti-MM activity [66]. These studies therefore provide the rationale for clinical protocols evaluating NPI-0052, alone and together with bortezomib, to improve patient outcome in MM. Similar antitumor activity by NPI-0052 has been described in chronic lymphocytic leukemia and colon cancer cells [72,73].

Carfilzomib (PR-171) is a structurally- and mechanistically-novel proteasome inhibitor that exhibits a high level of selectivity for a single active site in the proteasome, as well as minimal cross reactivity to other protease classes. In models of MM, carfilzomib potently bound and specifically inhibited the chymotrypsin-like proteasome and immunoproteasome activities, resulting in accumulation of ubiquitinated substrates. Carfilzomib induced a dose- and time-dependent inhibition of proliferation, ultimately leading to apoptosis. Programmed cell death was associated with activation JNK, mitochondrial membrane depolarization, release of cytochrome c, and activation of both intrinsic and extrinsic caspase pathways. This agent also inhibited proliferation and activated apoptosis in patient-derived MM cells, as well as neoplastic cells from patients with other hematologic malignancies. Importantly, carfilzomib showed increased efficacy compared to bortezomib, and was active against bortezomib-resistant MM cell lines, and samples from patients with clinical bortezomib resistance. Carfilzomib also overcame resistance to other conventional agents, and acted synergistically with dexamethasone to enhance cell death. In addition to the Phase II trial in solid tumors, carfilzomib is currently being evaluated in two Phase II single-agent trials in multiple myeloma and a Phase I study in lymphoma. Phase I clinical studies have shown that patients with hematologic malignancies (MM and Waldenström's macroglobulinemia) who have relapsed or progressed following multiple therapies can achieve durable anti-tumor responses with carfilzomib [70].

Stapnes *et al.* [68] tested antiproliferative and proapoptotic effects of carfilzomib (10 nmol/l) in comparison with bortezomib (25 nmol/l) on primary AML cells derived from a total of 6 AML patients *in vitro*. An increased percentage of apoptotic cells accompanied by a statistically significant reduction of AML cells viability were detected mainly after 18 hours of culture. The antiproliferative effect of both proteasome inhibitors was also assayed for colony formation. Both, carfilzomib and bortezomib reduced AML colony formation and thus also affect the more immature clonogenic subset within the hierarchically organised AML cell population [68]. AML cells derived from 15 unselected patients were cultured together with normal bone marrow stem cells (BMSC) in the presence or absence of both proteasome inhibitors. Both drugs inhibited AML cell proliferation and decreased AML cell viability, even in the presence of BMSC. BMSC remained viable and adherent. The antiproliferative and proapoptotic effects of both proteasome inhibitors are not counteracted by the presence of non-leukemic stromal cells [68]. Both proteasome inhibitors showed similar antiproliferative effects for primary acute lymphoblastic leukemia (ALL) blasts from 8 unselected patients [68].

HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AND THEIR COMBINATION WITH PROTEASOME INHIBITORS

Histone deacetylase (HDAC) inhibitors are compounds that inhibit HDACs, enzymes that, in conjunction with histone acetylases, regulate the acetylation state of histones and of a growing number of nonhistone proteins including many transcription factors. There are several structural classes of histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDIs), including hydroxamic acids such as suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat; Zolinza), belinostat (PXD101) or LAQ824/LBH589; cyclic peptides such as romidepsin (depsipeptide; FK-228; FR901228) or a potent immunosuppressant FR23522; short chain fatty acids such as phenylbutyrate (Buphenyl) and valproic acid (Depakote; Depakene); and benzamides such as MS-275 (Benzamidine) or an isotype-specific aminophenylbenzamide MGCD0103 [74-77].

Coadministration of HDAC inhibitors with the proteasome inhibitors induce a marked increase in mitochondrial injury and apoptosis in many types of cancer cells. These events are associated with transcription factor NF- κ B inactivation, c-Jun NH₂-terminal kinase activation, p63 induction, and caspase-dependent cleavage of p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, and Bcl-2, as well as antiapoptotic protein myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1), X-linked inhibitor of apoptosis, and cyclin D1 downregulation. Coadministration of HDAC inhibitors with the proteasome inhibitors induce also reactive oxygen species (ROS) generation and further apoptosis.

Histone Deacetylases (HDACs)

HDACs can be grouped into four distinct classes. Class I HDACs (HDAC1,2,3, and 8 with molecular weights of 22-55 kDa and homology in their catalytic sites) are ubiquitously expressed. Class II HDACs (HDAC4,5,7, and 9 with molecular weights between 120 kDa and 135 kDa) exhibit a tissue-specific pattern of expression. A subclass IIa HDACs (HDAC6 and 10) contain two catalytic sites. Both class I and II HDACs are zinc-binding enzymes, which are inhibited by SAHA at nanomolar concentrations. Class III HDACs are not inhibited by SAHA and do not have histones as primary targets. Class I and II HDACs, in addition to histones, have many nonhistone protein targets, including transcription factors and proteins that regulate cell proliferation, migration and death. Class IV or IIb HDACs includes HDAC11, which is distinct from the other classes, has conserved residues in the catalytic core region that are shared by both class I and II enzymes.

Aberrant expression of HDACs and their presence in complexes of fusion transcription factors complexes has been found in many leukemias, lymphomas and solid tumors [78,79]. Inhibitors of HDACs (HDIs) induce differentiation and/or apoptosis of transformed cells *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo* and they potentiate the proapoptotic effect of proteasome inhibitors.

Histone Deacetylase Inhibitors

Acetylation of nucleosomal histones in part regulates gene transcription in most cells. Differential acetylation of

nucleosomal histones results in either transcriptional activation (hyperacetylation and an open chromatin configuration) or repression (hypoacetylation and compacted chromatin) [80,81]. The role of chromatin remodeling in carcinogenesis was studied with the help of HDIs. HDIs induce the hyperacetylation of nucleosomal histones in cells resulting in the expression of aberrantly repressed genes (eg, tumor suppressor genes) that produce growth arrest, terminal differentiation, and/or apoptosis in carcinoma cells, depending on the HDI and dose used, and the cell type [82-85]. The inappropriate recruitment of HDACs provides at least one mechanism by which oncogenes could alter gene expression in favor of excessive proliferation. Thus, orally active HDIs with low toxicity towards normal cells and tissues, which would effectively inhibit tumor growth are needed for epigenetic anticancer therapy. In October 2006, the US Food and Drug Administration approved the first drug of this new class, vorinostat (SAHA, Zolinza) for treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Several further HDIs are in clinical trials. HDIs have shown significant activity against a variety of hematological and solid tumors at doses that are well tolerated by patients, both in monotherapy as well as in combination therapy with other drugs.

Induction of Apoptosis by Histone Deacetylase Inhibitors

An almost universal effect of HDI treatment is the upregulated expression of the cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor p21^{WAF1/CIP1}, a direct consequence of hyperacetylation of its promoter region and increased transcription of the gene [86]. No single mechanism for HDI-induced cell death has been identified. HDIs affect both G1 and G2/M cell cycle progression. G1 phase cell cycle block connected with p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} upregulation was observed in most cell lines treated with HDIs [87]. HDI treatment causes cells to undergo aberrant mitosis and results in catastrophic mitotic failure triggering apoptosis [88,89]. Inhibition of HDAC activity was found to cause the improper kinetochore localization of the mitotic checkpoint proteins, and to prolong mitotic arrest, and thus to lead to chromosomal instability due to aberrant exit from the mitotic cell cycle arrest. In addition, treatment with HDI attenuated the activations of p38 and extracellular signal-regulated kinases, and increased the expression levels of cIAP-1 protein (a member of the inhibitor of apoptosis protein family), suggesting that the observed increased adaptation and chromosomal instability induced by inhibiting HDAC activity might be directly connected with the activations of cell survival and/or antiapoptotic signals. Moreover, the treatment of cells with mitotic defects with HDI increased their susceptibility to chromosomal instability. HDAC activity plays an important role in the regulation of mitotic checkpoint activation, and thus the aberrant control of HDAC activity contributes to chromosomal instability.

HDI treatment disrupts the integrity of the mitochondrial membrane. This is accompanied by loss of mitochondrial membrane potential and release into the cytoplasm of cytochrome c and Smac/DIABLO which potentiate caspase activation. Overexpression of the antiapoptotic protein Bcl-2

reduces HDI-induced cell death. The cleavage and activation of the proapoptotic BH3-only protein Bid by HDI treatment was also detected. HDI-induced proteolytic activation of caspase-2, -7 and -8 was strictly dependent on caspase-9. Translocation of protein Bid into the mitochondria also depends on caspase-9 [90,91]. Although HDIs trigger the mitochondrial pathway of apoptosis, HDIs also activate the extrinsic apoptosis pathway, including increased Fas (also known as CD95 and APO-1) and Fas ligand expression, activation of caspase-8, and cleavage of Bid [92-96]. Death receptors are cell surface receptors belonging to the tumor necrosis factor (TNF) super family, which trigger apoptosis upon ligand binding. One from the best characterised death receptors is Fas.

Synergistic Induction of Oxidative Injury and Apoptosis by Coadministration of HDAC Inhibitors with the Proteasome Inhibitors in Hematological Malignancies Cells

NF- κ B activation is reciprocally regulated by RelA/p65 acetylation and deacetylation, which are mediated by histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs). In leukemia cells, NF- κ B activation by the HDAC inhibitors (HDI) MS-275 and suberoylanilide hydroxamic acid was associated with hyperacetylation and nuclear translocation of RelA/p65. Interference with these events by either pharmacological or genetic means leads to a dramatic increase in HDI-mediated lethality through enhanced oxidative damage, downregulation of NF- κ B-dependent antiapoptotic proteins, and stress-related c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation [97]. Bortezomib inhibits NF- κ B activation through inhibition of I κ B proteasome degradation, stabilizes I κ B and markedly potentiates apoptosis induced by HDI. Bortezomib works synergistically to enhance the proapoptotic effect of HDI and overcomes the overexpression of the antiapoptotic protein Bcl-2. Bortezomib induces Bcl-2 phosphorylation and its cleavage associated with arrest of the cell cycle at G₂ - M phase [98].

Synergistic induction of oxidative stress and apoptosis in human multiple myeloma cells was observed after sequential exposure to bortezomib with HDAC inhibitors [99]. These agents combination potentially induces mitochondrial dysfunction and apoptosis of multiple myeloma cells through a radical oxygen species-dependent mechanism.

Inhibition of Aggresome Formation by HDAC-6 Inhibitors Potentiate the Efficacy of Bortezomib

Bortezomib triggers apoptosis in pancreatic cancer cells, but the mechanisms involved have not been fully elucidated. Nawrocki *et al.* [100] described that pancreatic cancer cells exposed to bortezomib formed aggregates of ubiquitin-conjugated proteins ("aggresomes") *in vitro* and *in vivo*. Bortezomib-induced aggresome formation was determined to be cytoprotective and could be disrupted using histone deacetylase (HDAC)-6 small interfering RNA or chemical HDAC inhibitors, which resulted in endoplasmic reticulum stress and synergistic levels of apoptosis *in vitro* and in an orthotopic pancreatic cancer xenograft model *in vivo*. Interestingly, bortezomib did not induce aggresome formation in

immortalized normal human pancreatic epithelial cells *in vitro* or in murine pancreatic epithelial cells *in vivo*. In addition, these cells did not undergo apoptosis following treatment with bortezomib, suberoylanilide hydroxamic acid, or the combination, showing tumor selectivity. Taken together, this study shows that inhibition of aggresome formation can strongly potentiate the efficacy of bortezomib and provides the foundation for clinical trials of bortezomib in combination with HDAC inhibitors for the treatment of pancreatic cancer or multiple myeloma [101] and possibly in other hematological malignancies.

CLINICAL TRIALS USING PROTEASOME INHIBITORS OR THEIR COMBINATION WITH HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AS A NOVEL TREATMENT STRATEGY IN LEUKEMIA

Although the treatment of patients suffering from leukemia has considerably improved throughout the last years, new chemotherapeutic agents are urgently required to further improve and optimise treatment protocols, minimise side-effects and prolong overall survival rates. Relapsing patients usually develop resistance to standard chemotherapeutics and new agents are needed. As far as concerns acute myeloid leukemia (AML), bortezomib has been tested in three small clinical trials, in one it was used as a single agent [102] and in two others, bortezomib was combined with conventional agents [103, 104].

Bortezomib as a Single Agent in Refractory or Relapsed AML

In the phase I study [102], authors investigated the maximum tolerated dose and dose-limiting toxicity of bortezomib as a single agent in patients with acute leukemias refractory to or relapsing after prior therapy. Fifteen patients were treated with 0.75 (n = 3), 1.25 (n = 7), or 1.5 (n = 5) mg/m² bortezomib administered twice weekly for 4 weeks every 6 weeks. Dose-limiting toxicity included orthostatic hypotension (n = 2), nausea (n = 2), diarrhea (n = 1), and fluid retention (n = 1), all at 1.5 mg/m² bortezomib. Proteasome inhibition was dose dependent and reached 68% at 1.5 mg/m² bortezomib. Peak inhibition was observed 1 h after treatment and returned to near baseline levels by 72 h after treatment. Incubation of blast cells with bortezomib *in vitro* showed induction of apoptosis in three of five patients investigated. Authors conclude that the maximum tolerated dose of bortezomib in patients with acute leukemia is 1.25 mg/m², using a twice-weekly for 4 weeks every 6 weeks schedule. The *in vitro* evidence of antileukemia and transient hematological improvements observed in some patients warrants further investigation of bortezomib in acute leukemias, probably in combination with other agents.

Combination of Bortezomib with Conventional Agents

In the first study [103], authors determined the maximum tolerated dose (MTD) and dose-limiting toxicities of bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin (PegLD) but they used only 2 patients with AML. Bortezomib was given on days 1, 4, 8, and 11 from 0.90 to 1.50 mg/m² and PegLD

on day 4 at 30 mg/m² to 42 patients with advanced hematologic malignancies. Grade 3 or 4 toxicities in at least 10% of patients included thrombocytopenia, lymphopenia, neutropenia, fatigue, pneumonia, peripheral neuropathy, febrile neutropenia, and diarrhea. The MTD based on cycle 1 was 1.50 and 30 mg/m² of bortezomib and PegLD, respectively. However, due to frequent dose reductions and delays at this level, 1.30 and 30 mg/m² are recommended for further study. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies did not find significant drug interactions between these agents. Antitumor activity was seen against multiple myeloma, with 8 of 22 evaluable patients having a complete response (CR) or near-CR, including several with anthracycline-refractory disease, and another 8 having partial responses (PRs). One patient with relapsed/refractory T-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) achieved a CR, whereas 2 patients each with acute myeloid leukemia and B-cell NHL had PRs.

Bortezomib/PegLD was safely administered in this study with promising antitumor activity, supporting further testing of this regimen.

In the further study [104], bortezomib was given on days 1, 4, 8, and 11 at doses of 0.7, 1.0, 1.3, or 1.5 mg/m² with idarubicin 12 mg/m² on days 1 to 3 and cytarabine 100 mg/m²/day on days 1 to 7. A total of 31 patients were enrolled. The median age was 62 years, and 16 patients were male. Nine patients had relapsed AML (ages, 18-59 years, n = 4 and > or = 60 years, n = 5). There were 22 patients of > or = 60 years with previously untreated AML (eight with prior myelodysplasia/myeloproliferative disorder or cytotoxic therapy). All doses of bortezomib, up to and including 1.5 mg/m², were tolerable. Nonhematologic grade 3 or greater toxicities included 12 hypoxia (38%; 11 were grade 3), 4 hyperbilirubinemia (13%), and 6 elevated aspartate aminotransferase (19%).

Overall, 19 patients (61%) achieved complete remission (CR) and three had CR with incomplete platelet recovery. Pharmacokinetic studies revealed that the total body clearance of bortezomib decreased significantly ($P < 0.01$, $N = 26$) between the first (mean \pm SD, 41.9 \pm 17.1 L/h/m²) and third (18.4 \pm 7.0 L/h/m²) doses. Increased bone marrow expression of CD74 was associated with CR. The combination of bortezomib, idarubicin, and cytarabine showed a good safety profile. The recommended dose of bortezomib for phase II studies with idarubicin and cytarabine is 1.5 mg/m² [104].

Experimental Studies Comparing Bortezomib and Conventional Agents Activity in AML Cells

AML is a genetically heterogeneous clonal disorder characterized by the accumulation of acquired somatic genetic alterations in hematopoietic progenitor cells that alter normal mechanisms of self-renewal, proliferation and differentiation. There is the great problem of AML heterogeneity due to wide array of genetic lesions and immunophenotypic profiles. AML can be divided into immature (CD34⁺) and mature (CD34⁻) forms. Immature AML forms are associated with drug resistance and poorer outcome [105,106]. Colado

et al. [107] carried out a detailed analysis of the *in vitro* activity and mechanism of action of bortezomib on AML cells using both cell lines and fresh cells from patients with immature or mature AML. Activity of bortezomib was compared with that of conventional agents. Cells were incubated with 50 nM bortezomib, 1 μ M doxorubicin or 1 μ M cytarabine, or without any drug (control) for 18 h. The number of apoptotic cells was measured in each sample. Bortezomib induced caspase-3-dependent apoptosis in HEL cells because caspase-3 inhibitor blocked this apoptosis. The average percentage of apoptosis induced by bortezomib in the fresh total blast AML cell samples was $48 \pm 22\%$ (mean \pm SD). In 14 from 28 samples, bortezomib induced apoptosis in $\geq 50\%$ of leukemic cells. The apoptotic activity of bortezomib on CD34⁺ blast cells was similar to that observed in CD34⁺ blast cells.

Gil *et al.* [108] analysed *in vitro* drug resistance to bortezomib and other anticancer drugs in de novo and relapsed adult AML cells of 46 patients. AML cells were sensitive to bortezomib and the *in vitro* activity of this drug was not influenced by the presence of drug resistance proteins, which was also observed by other investigators [109]. Thus bortezomib is insensitive to multidrug resistance proteins and this is important for treatment of relapsed/refractory AML patients with overexpression of multidrug resistance proteins.

Riccioni *et al.* [110] explored *in vitro* the sensitivity of leukemic blasts derived from 30 AML patients to bortezomib. Bortezomib induced the apoptosis of primary AML blasts. 18 AMLs were highly sensitive to the proapoptotic effect of bortezomib. Remaining AML cases were moderately sensitive to bortezomib. The majority of AMLs sensitive to bortezomib showed immunophenotypic features of the M4 and M5 French-American-British classification subtypes and displayed myelomonocytic features. All AMLs with mutated *FLT3* were in the bortezomib-sensitive group. Bortezomib activated caspase-8 and caspase-3 and decreased cellular FLICE (Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme)-inhibitory protein (c-FLIP) levels in AML blasts.

These results strongly suggest that proteasome inhibition should be considered in AML therapy.

Experimental Studies Using HDAC Inhibitors and Their Combination with Bortezomib

Modulation of gene expression through HDAC inhibition is considered a possible therapeutic strategy in AML [111,112]. *In vitro* effects and basal gene expression of structurally different HDAC inhibitors (HDIs) were examined. Primary human AML cells were derived from 59 consecutive patients. The HDIs valproic acid, PXD101, trichostatin A and sodium butyrate inhibited leukemic and clonogenic cell proliferation and increased apoptosis in a dose-dependent manner when tested at high concentrations. However, at lower concentrations proliferation increased for a subset of patients. This divergence was also observed in the presence of all-trans retinoic acid, theophylline and decit-

abine, and in cocultures with bone marrow stromal cells. Levels of IL-1 β , IL-6, GM-CSF and TNF α increased.

Based on the basal expression of 100 genes the patients with growth enhancement at intermediate HDAC inhibitor concentrations and those without this response were clustered into two mutually exclusive groups. Functional characterization and gene expression analyses identify AML patient subsets that differ in their response to HDAC inhibitors. These observations may explain why HDAC inhibitor therapy affects only a subset of AML patients [111-113].

The effect of bortezomib (10 nmol/l) and HDAC inhibitor valproic acid (1.2 mmol/l) on cytokine-dependent AML cell proliferation was tested [65]. Bortezomib caused 62% growth inhibition when tested alone and 79% inhibition in combination with valproic acid, whereas valproic acid alone caused no significant inhibition. HDAC inhibitors are promising candidates for molecular-targeted therapy for leukemia. Mechanisms of cytotoxic effects of deipeptide were markedly enhanced by bortezomib in HL-60 and K562 cells [114]. Caspase-9 was activated, the mitochondrial membrane was permeabilized and cytochrome c was released and this event is almost completely blocked by the overexpression of Bcl-2. The mitochondrial damage caused the translocation of Bax to the mitochondria, mitochondrial depolarization and activation of caspases.

Antitumor Activity of Bortezomib in Combination with TRAIL in AML

Conticello *et al.* [115] examined the sensitivity of bone marrow cells from AML patients (34 patients; 25 newly diagnosed, 4 relapsed, 5 refractory) to bortezomib alone or in combination with TRAIL, a member of the tumor necrosis factor (TNF) family that induces apoptosis in tumor cells while sparing normal cells. Bortezomib induced cell death in blasts from all 34 AML patients. Apoptosis was connected to a downregulation of antiapoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1, an upregulation of TRAIL-R1, TRAIL-R2, p21^{CIP1}, activation of executioner caspases and a loss of the mitochondrial membrane potential. Bortezomib primed also TRAIL-resistant AML cells for enhanced TRAIL-mediated killing. These results suggest that a combination of bortezomib or other proteasome inhibitors and TRAIL could be effective for treating AML patients, even patients who are refractory to conventional chemotherapy.

Our Experimental Studies on Induction of Apoptosis in AML Cells

We [116] studied the effect of TGF- β 1 and of bortezomib on induction of apoptosis in human acute myeloid leukemia cell lines ML-1, ML-2, CTV-1 and KASUMI1. Leukemia cells were preincubated for 24-96 h without addition (control group) or with TGF- β 1 (5 ng/ml or 10 ng/ml) or with bortezomib (4 nM or 10 nM). Apoptosis was detected by flow cytometry using annexin V-FITC/propidium iodide assay and by cell cycle analysis. Caspase-3-like enzyme activity was measured by enzymatic cleavage of fluorogenic peptide substrate, Ac-DEVD-7-amino-4-methyl-coumarin. Statistical

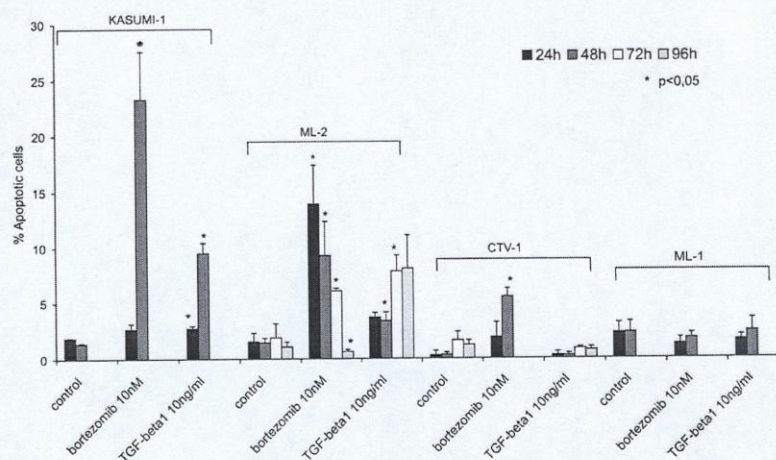


Fig. (6). Induction of apoptosis by bortezomib in comparison with TGF- β 1 in human leukemia cells of lines KASUMI-1, ML-2, CTV-1 and ML-1. Leukemia cells were preincubated for 24-96 h without addition (control group) or with bortezomib (10 nM) or with TGF- β 1 (10 ng/ml). Apoptosis was detected by flow cytometry using annexin V-FITC/propidium iodide assay. Statistical significance of results was analyzed by Student's paired t-test.

significance of the experimental results was analyzed by Student's paired t-test.

TGF- β 1 inhibited DNA synthesis only in KASUMI-1 cells but not in other leukemia cells used. Bortezomib (10 nM) was potent inhibitor of DNA synthesis, measured by incorporation of [3 H]thymidine into DNA, in all four types of leukemia cells and induced apoptosis in KASUMI-1, ML-2 and CTV-1 cells but not in ML-1 cells as is shown in Fig. (6). KASUMI-1 and ML-2 cells were also sensitive to induc-

tion of apoptosis by TGF- β 1 but in lesser extent than by bortezomib. Kinetics of apoptosis was different in individual cell lines and was slower in induction by TGF- β 1 than by bortezomib. Bortezomib (4 nM or 10 nM) induced caspase-3 in ML2 cells after 24 h treatment as is presented in Fig. (7) but only 10 nM bortezomib induced caspase-3 after 48 h treatment in KASUMI1 cells as is demonstrated in Fig. (8).

Our results show antiproliferative and proapoptotic effects of bortezomib in human AML cell lines. Only ML-1

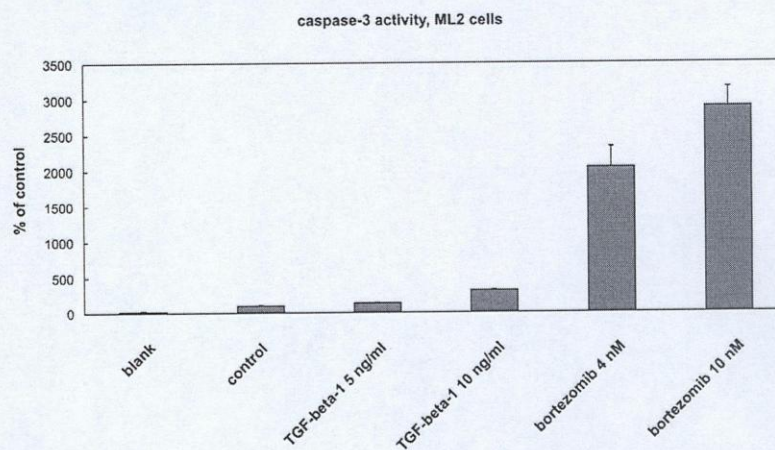


Fig. (7). Caspase-3 activity in ML-2 cells treated for 24 h without addition (control group) or with bortezomib (4nM or 10 nM) or with TGF- β 1 (10 ng/ml or 20 ng/ml). Caspase-3-like enzyme activity was measured by enzymatic cleavage of fluorogenic peptide substrate, Ac-DEVD-7- amino-4-methyl-coumarin. Statistical significance of results was analyzed by Student's paired t-test.

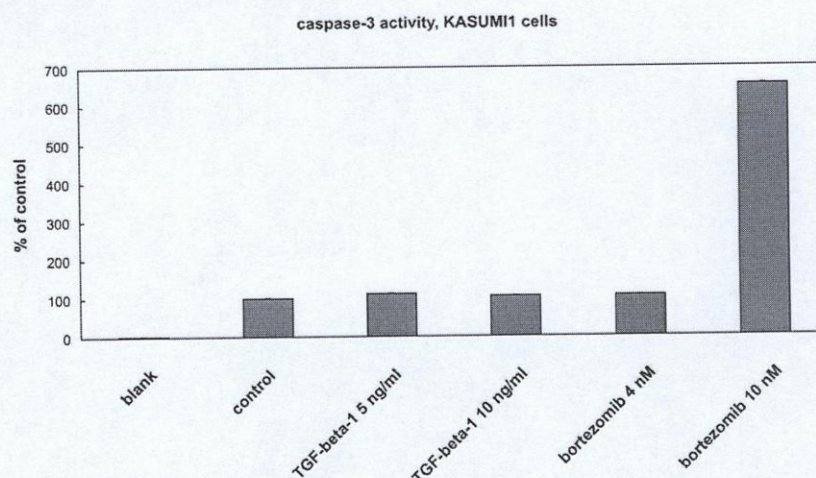


Fig. (8). Caspase-3 activity in KASUMI-1 cells treated for 48 h without addition (control group) or with bortezomib (4nM or 10 nM) or with TGF- β 1 (5 ng/ml or 10 ng/ml). Caspase-3-like enzyme activity was measured by enzymatic cleavage of fluorogenic peptide substrate, Ac-DEVD-7- amino-4-methyl-coumarin. Statistical significance of results was analyzed by Student's paired t-test.

cells were resistant to the induction of apoptosis by bortezomib. We confirmed also great heterogeneity of AML cells.

Effect of Bortezomib as a Single Agent or in Combination with HDAC Inhibitors or with Other Conventional Agents in Further Types of Leukemia

Bortezomib as a single agent or combined with HDAC inhibitors or with other drugs inhibits growth and induces apoptosis also in Bcr/Abl positive chronic myeloid leukemia cells sensitive or resistant to imatinib mesylate [117-119], chronic lymphocytic leukemia cells [120-125] and adult T-cell leukemia [126-131].

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Proteasomal proteolysis relies on the activity of six catalytically active proteasomal subunits (β 1, β 2, β 5 and three immunosubunits β 1i, β 2i, and β 5i) of the 20S proteasome or immunoproteasome core. These subunits have proteolytic activities (β 1-caspase like activity, β 2-trypsin-like activity, and β 5- chymotrypsin-like activity). Activities and constitutive subunits of proteasome vary in individual cases of AML and also between leukemia types [132]. This influences the sensitivity of the leukemias to proteasome inhibitors. Bortezomib inhibits the β 5 subunit activity and to a lesser extent the β 1 subunit activity. At higher concentrations, bortezomib inhibits also β 2 subunit activity. The sensitivity of cells to bortezomib depends on the β 2 to β 5/ β 1 activity ratio. When this ratio is relatively low, cells are sensitive to bortezomib. However, the relatively high ratio means resistancy of cells to bortezomib [132]. Recently, molecular basis of bortezomib resistance has been described [133]. An Ala49Thr mutation residing in a highly conserved bortezomib-binding pocket in the proteasome β 5 subunit (PSMB5) protein and a

dramatic overexpression of this mutated PSMB5 protein cause bortezomib resistance [133]. Bortezomib sensitivity in bortezomib-resistant cells can be restored by specific siRNA-mediated silencing of *PSMB5* gene expression [129]. In future, it is possible to tailor proteasome inhibitors to individual leukemia cases where the predominant proteolytic activities of the proteasomes are determined using labeled probes which bind the catalytic sites.

Bortezomib is an excellent example of a novel highly effective agents that had been quickly translated to clinical practice. Preclinical and clinical data demonstrate synergistic activity with other agents in relapsed and refractory multiple myeloma and mantle cell lymphoma, and also in newly diagnosed patients with these diseases. Preliminary results suggest that response rates may be improved by this combination therapy. Further studies are necessary to find the best sequence and combination of effective agents in order to improve the prognosis of patients in the near future. Adverse effects related to bortezomib are predictable, manageable, and reversible and if necessary, can be solved by dose reductions.

Bortezomib as single agent or combined with HDAC inhibitors or with other drugs inhibits growth and induces apoptosis also in leukemia cells sensitive or resistant to conventional chemotherapeutics. Results of studies in this field strongly suggest that proteasome inhibition should be considered in antileukemic therapies [134,135]. Moreover, a new generation of irreversible proteasome inhibitors (salinosporamide A and carfilzomib) that in preclinical studies at least partially overcome bortezomib resistance *in vitro* have been developed. These inhibitors are more potent, well tolerated, and have less neurotoxicity than bortezomib.

Hematopoietic cell transplantation (HCT) offers potentially curative therapy for patients with MDS and leukemia. The incidence of acute graft-versus-host disease (GVHD) is an undesirable complication of allogeneic bone marrow transplantation (BMT). Bortezomib, administered immediately following murine allogeneic BMT resulted in marked inhibition of acute GVHD with retention of graft-versus-tumor effects [136]. However, delayed bortezomib administration (5 or more days after BMT) increased GVHD susceptibility and significantly accelerated GVHD-dependent morbidity [137].

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic NR/9045-3, VZ 00023736 from the Ministry of Health of the Czech Republic, and grant LC 06044 from Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic.

REFERENCES

- [1] Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, 425-479.
- [2] Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, 503-533.
- [3] Glickman, M.H.; Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.*, **2002**, *82*, 373-428.
- [4] Pickart, C.M.; Cohen R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, *5*, 177-187.
- [5] Hershko, A. Rev.: Nobel Lecture. The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.*, **2005**, *12*, 1191-1197.
- [6] Ciechanover, A. Intracellular protein degradation from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting: Nobel Lecture, December 8, 2004. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2007**, *1116*, 1-28.
- [7] Rose, I. Rev.: Nobel Lecture. Ubiquitin at Fox Chase. *Cell Death Differ.*, **2005**, *12*, 1162-1166.
- [8] Wilkinson, K.D. Ubiquitin: A Nobel protein. *Cell*, **2004**, *119*, 741-745.
- [9] Koegl, M.; Hoppe, T.; Schlenker, S.; Ulrich, H.D.; Mayer, T.U.; Jentsch, S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multi-ubiquitin chain assembly. *Cell*, **1999**, *96*, 635-644.
- [10] Staub, O.; Rotin, D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiol. Rev.*, **2006**, *86*, 669-707.
- [11] Savory, P.J.; Rivett, A.J. Leupeptin-binding site(s) in the mammalian multicatalytic proteinase complex. *Biochem. J.*, **1993**, *289*, 45-48.
- [12] Vinitsky, A.; Cardozo, C.; Sepp-Lorenzino, L.; Michaud, C.; Orłowski, M. Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 29860-29866.
- [13] Imajoh-Ohmi, S.; Kawaguchi, T.; Sugiyama, S.; Tanaka, K.; Omura, S.; Kikuchi, H. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *217*, 1070-1077.
- [14] Shinohara, K.; Tomioka, M.; Nakano, H.; Toné, S.; Ito, H.; Kawashima, S. Apoptosis induction resulting from proteasome inhibition. *Biochem. J.*, **1996**, *317*, 385-388.
- [15] Delic, J.; Masdehors, P.; Omura, S.; Cosset, J.M.; Dumont, J.; Binet, J.L.; Magdelénat, H. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo- and radioresistant human chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to TNF- α -initiated apoptosis. *Br. J. Cancer*, **1998**, *77*, 1103-1107.
- [16] Orłowski, R.Z.; Eswara, J.R.; Lafond-Walker, A.; Grever, M.R.; Orłowski, M.; Dang, C.V. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 4342-4348.
- [17] Vinitsky, A.; Michaud, C.; Powers, J.C.; Orłowski, M. Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 9421-9428.
- [18] Palombella, V.J.; Rando, O.J.; Goldberg, A.L.; Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*, **1994**, *78*, 773-785.
- [19] Rock K.L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D.; Goldberg, A.L. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **1994**, *78*, 761-771.
- [20] Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A.A.; Dick, L.R.; Grenier, L.; Klunder, J.M.; Ma, Y.T.; Plamondon, L.; Stein, R.L. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 333-338.
- [21] Adams, J.; Kauffman, M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.*, **2004**, *22*, 304-311.
- [22] Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 349-360.
- [23] Kane, R.C.; Bross, P.F.; Farrell, A.T.; Pazdur, R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist*, **2003**, *8*, 508-551.
- [24] Kane, R.C.; Farrell, A.T.; Sridhara, R.; Pazdur, R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 2955-2960.
- [25] Richardson, P.G.; Sonneveld, P.; Schuster, M.W.; Irwin, D.; Stadtmauer, E.A.; Facon, T.; Harousseau, J.L.; Ben-Yehuda, D.; Lonial, S.; San Miguel, J.F.; Cavenagh, J.D.; Anderson, K.C. Safety and efficacy of bortezomib in high-risk and elderly patients with relapsed multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, **2007**, *137*, 429-435.
- [26] Mitsiades, C.S.; Hayden, P.J.; Anderson, K.C.; Richardson, P.G. From the bench to the bedside: emerging new treatments in multiple myeloma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, **2007**, *20*, 797-816.
- [27] Chauhan, D.; Hideshima, T.; Anderson, K.C. Targeting proteasomes as therapy in multiple myeloma. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2008**, *615*, 251-260.
- [28] Goy, A.; Younes, A.; McLaughlin, P.; Pro, B.; Romaguera, J.E.; Hagemeister, F.; Fayad, L.; Dang, N.H.; Samaniego, F.; Wang, M.; Broglio, K.; Samuels, B.; Gilles, F.; Sarris, A.H.; Hart, S.; Trehu, E.; Schenkein, D.; Cabanillas, F.; Rodriguez, A.M. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 667-675.
- [29] O'Connor, O.A.; Wright, J.; Moskowitz, C.; Muzzy, J.; MacGregor-Cortelli, B.; Stubblefield, M.; Straus, D.; Portlock, C.; Hamlin, P.; Choi, E.; Dumetrescu, O.; Esseltine, D.; Trehu, E.; Adams, J.; Schenkein, D.; Zelenetz, A.D. Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, **2005**, *23*, 676-684.
- [30] Suh, K.S.; Gay, A. Bortezomib in mantle cell lymphoma. *Future Oncol.*, **2008**, *4*, 149-168.
- [31] Hideshima, T.; Chauhan, D.; Richardson, P.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Hayashi, T.; Munshi, N.; Dang, L.; Castro, A.; Palombella, V.; Adams, J.; Anderson, K.C. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 16639-16647.
- [32] Hideshima, T.; Richardson, P.; Chauhan, D.; Palombella, V.J.; Elliott, P.J.; Adams, J.; Anderson, K.C. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 3071-3076.
- [33] Roccaro, A.M.; Vacca, A.; Ribatti, D. Bortezomib in the treatment of cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.*, **2006**, *1*, 397-403.
- [34] Roccaro, A.M.; Hideshima, T.; Raju, N.; Kumar, S.; Ishitsuka, K.; Yasui, H.; Shiraishi, N.; Ribatti, D.; Nico, B.; Vacca, A.; Dammacco, F.; Richardson, P.G.; Anderson, K.C. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 184-191.
- [35] Hideshima, T.; Bradner, J.E.; Wong, J.; Chauhan, D.; Richardson, P.; Schreiber, S.L.; Anderson, K.C. Small-molecule inhibition of

- proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 8567-8572.
- [36] Nawrocki, S.T.; Carew, J.S.; Dunner, K., Jr.; Boise, L.H.; Chiao, P.J.; Huang, P.; Abbruzzese, J.L.; McConkey, D.J. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 11510-11519.
- [37] Nawrocki, S.T.; Carew, J.S.; Pino, M.S.; Highshaw, R.A.; Dunner, K., Jr.; Huang, P.; Abbruzzese, J.L.; McConkey, D.J. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 11658-11666.
- [38] Lee, A.H.; Iwakoshi, N.N.; Anderson, K.C.; Glimcher, L.H. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 9946-9951.
- [39] Obeng, E.A.; Carlson, L.M.; Gutman, D.M.; Harrington, W.J., Jr.; Lee, K.P.; Boise, H. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*, **2006**, *107*, 4907-4916.
- [40] Orłowski, R.Y.; Baldwin, A.S. NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol. Med.*, **2002**, *8*, 385-389.
- [41] Luo, J.L.; Maeda, S.; Hsu, L.C.; Yagita, H.; Karin, M. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell*, **2004**, *6*, 297-305.
- [42] Pikarsky, E.; Porat, R.M.; Stein, I.; Abramovitch, R.; Amit, S.; Kasem, S.; Gukovich-Pyest, E.; Urieli-Shoval, S.; Galun, E.; Ben-Neriah, Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, **2004**, *431*, 461-466.
- [43] Wang, C.Y.; Mayo, M.W.; Baldwin, A.S., Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, **1996**, *274*, 784-787.
- [44] Wang, C.Y.; Cusack, J.C., Jr.; Liu, R.; Baldwin, A.S., Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nat. Med.*, **1999**, *5*, 412-417.
- [45] Cusack, J.C., Jr.; Liu, R.; Houston, M.; Abendroth, K.; Elliott, P.J.; Adams, J.; Baldwin, A.S., Jr. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor- κ B inhibition. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 3535-3540.
- [46] Cusack, J.C.; Liu, R.; Baldwin, A.S. NF- κ B and chemoresistance: potentiation of cancer drugs via inhibition of NF- κ B. *Drug Resist. Updat.*, **1999**, *2*, 271-273.
- [47] Russo, S.M.; Tepper, J.E.; Baldwin, A.S., Jr.; Liu, R.; Adams, J.; Elliott, P.; Cusack, J.C., Jr. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF- κ B. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **2001**, *50*, 183-193.
- [48] Liu, S.; Liu, Z.; Xie, Z.; Pang, J.; Yu, J.; Lehmann, E.; Huynh, L.; Vukosavljevic, T.; Takei, M.; Klisovic, R.B.; Baiocchi, R.A.; Blum, W.; Porcu, P.; Garzon, R.; Byrd, J.C.; Perrotti, D.; Caligiuri, M.A.; Chan, K.K.; Wu, L.-C.; Marcucci, G. Bortezomib induces DNA hypomethylation and silenced gene transcription by interfering with Sp1/NF- κ B-dependent DNA methyltransferase activity in acute myeloid leukemia. *Blood*, **2008**, *111*, 2364-2373.
- [49] Herman, J.G.; Baylin, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Eng. J. Med.*, **2003**, *349*, 2042-2054.
- [50] Plass, C.; Oakes, C.; Blum, W.; Marcucci, G. Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.*, **2008**, *35*, 378-387.
- [51] Garcia-Manero, G. Demethylating agents in myeloid malignancies. *Curr. Opin. Oncol.*, **2008**, *20*, 705-710.
- [52] Ishii, Y.; Pirkmaier, A.; Alvarez, J.V.; Frank, D.A.; Keselman, I.; Logothetis, D.; Mandeli, J.; O'Connell, M.J.; Waxman, S.; Germain, D. Cyclin D1 overexpression and response to bortezomib treatment in a breast cancer model. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2006**, *98*, 1238-1247.
- [53] Keats, J.J.; Fonseca, R.; Chesi, M.; Schop, R.; Baker, A.; Chng, W.J.; Van Wier, S.; Tiedemann, R.; Shi, C.X.; Sebag, M.; Braggio, E.; Henry, T.; Zhu, Y.X.; Fogle, H.; Price-Troska, T.; Ahmann, G.; Mancini, C.; Brents, L.A.; Kumar, S.; Greipp, P.; Dispenzieri, A.; Bryant, B.; Mulligan, G.; Bruhn, L.; Barrett, M.; Valdez, R.; Trent, J.; Stewart, A.K.; Carpten, J.; Bergsagel, P.L. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*, **2007**, *12*, 131-144.
- [54] Dolcet, X.; Llobet, D.; Encinas, M.; Pallares, J.; Cabero, A.; Schoenenberger, J.A.; Comella, J.X.; Matias-Guiu, X. Proteasome inhibitors induce death but activate NF- κ B on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 22118-22130.
- [55] Rumpold, H.; Salvador, C.; Wolf, A.M.; Tilg, H.; Gastl, G.; Wolf, D. Knockdown of PgP resensitizes leukemic cells to proteasome inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, *361*, 549-554.
- [56] Richardson, P.G.; Briemberg, H.; Jagannath, S.; Wen, P.Y.; Barlogie, B.; Berenson, J.; Singhal, S.; Siegel, D.S.; Irwin, D.; Schuster, M.; Srkalovic, G.; Alexanian, R.; Rajkumar, S.V.; Limentani, S.; Alsina, M.; Orłowski, R.Z.; Najarian, K.; Esseltine, D.; Anderson, K.C.; Amato, A.A. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J. Clin. Oncol.*, **2006**, *24*, 3113-3120.
- [57] Lonial, S.; Waller, E.K.; Richardson, P.G.; Jagannath, S.; Orłowski, R.Z.; Giver, C.R.; Jaye, D.L.; Francis, D.; Giusti, S.; Torre, C.; Barlogie, B.; Berenson, J.R.; Singhal, S.; Schenkein, D.P.; Esseltine, D.L.; Anderson, J.; Xiao, H.; Heffner, L.T.; Anderson, K.C. SUMMIT/CREST Investigators. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood*, **2005**, *106*, 3777-3784.
- [58] Badros, A.; Goloubeva, O.; Dalal, J.S.; Can, I.; Thompson, J.; Rapoport, A.P.; Heyman, M.; Akpek, G.; Fenton, R.G. Neurotoxicity of bortezomib therapy in multiple myeloma: a single-center experience and review of the literature. *Cancer*, **2007**, *110*, 1042-1049.
- [59] San Miguel, J.; Bladé, J.; Boccadoro, M.; Cavenagh, J.; Glasmacher, A.; Jagannath, S.; Lonial, S.; Orłowski, R.Z.; Sonneveld, P.; Ludwig, H. A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *Oncologist*, **2006**, *11*, 51-61.
- [60] Feling, R.H.; Buchanan, G.O.; Mincer, T.J.; Kauffman, C.A.; Jensen, P.R.; Fenical, W. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, *42*, 355-357.
- [61] Macherla, V.R.; Mitchell, S.S.; Manam, R.R.; Reed, K.A.; Chao, T.H.; Nicholson, B.; Deyanat-Yazdi, G.; Mai, B.; Jensen, P.R.; Fenical, W.F.; Neuteboom, S.T.; Lam, K.S.; Palladino, M.A.; Potts, B.C. Structure-activity relationship studies of salinosporamide A (NPI-0052), a novel marine derived proteasome inhibitor. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 3684-3687.
- [62] Chauhan, D.; Catley, L.; Li, G.; Podar, K.; Hideshima, T.; Velankar, M.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Yasui, H.; Letai, A.; Ovaa, H.; Berkens, C.; Nicholson, B.; Chao, T.H.; Neuteboom, S.T.; Richardson, P.; Palladino, M.A.; Anderson, K.C. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*, **2005**, *8*, 407-419.
- [63] Chauhan, D.; Hideshima, T.; Anderson, K.C. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. *Br. J. Cancer*, **2006**, *95*, 961-965.
- [64] Williamson, M.J.; Blank, J.L.; Bruzzese, F.J.; Cao, Y.; Daniels, J.S.; Dick, L.R.; Labutti, J.; Mazzola, A.M.; Patil, A.D.; Reimer, C.L.; Solomon, M.S.; Stirling, M.; Tian, Y.; Tsu, C.A.; Weatherhead, G.S.; Zhang, J.X.; Rolfe, M. Comparison of biochemical and biological effects of ML858 (salinosporamide A) and bortezomib. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, *5*, 3052-3061.
- [65] Miller, C.P.; Ban, K.; Dujka, M.E.; McConkey, D.J.; Munsell, M.; Palladino, M.; Chandra, J. NPI-0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells. *Blood*, **2007**, *110*, 267-277.
- [66] Chauhan, D.; Singh, A.; Brahmandam, M.; Podar, K.; Hideshima, T.; Richardson, P.; Munshi, N.; Palladino, M.A.; Anderson, K.C. Combination of proteasome inhibitors bortezomib and NPI-0052 trigger *in vivo* synergistic cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, **2008**, *111*, 1654-1664.

- [67] Demo, S.D.; Kirk, C.J.; Aujay, M.A.; Buchholz, T.J.; Dajee, M.; Ho, M.N.; Jiang, J.; Laidig, G.J.; Lewis, E.R.; Parlati, F.; Shenk, K.D.; Smyth, M.S.; Sun, C.M.; Vallone, M.K.; Woo, T.M.; Molineaux, C.J.; Bennett, M.K. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 6383-6391.
- [68] Stapnes, C.; Døskeland, A.P.; Hatfield, K.; Ersvaer, E.; Rynningen, A.; Lorens, J.B.; Gjertsen, B.T.; Bruserud, O. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.*, **2007**, *136*, 814-828.
- [69] Kuhn, D.J.; Chen, Q.; Voorhees, P.M.; Strader, J.S.; Shenk, K.D.; Sun, C.M.; Demo, S.D.; Bennett, M.K.; van Leeuwen, F.W.; Chanan-Khan, A.A.; Orlowski, R.Z. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*, **2007**, *110*, 3281-3290.
- [70] Orlowski, R.Z.; Kuhn, D.J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 1649-1657.
- [71] Ahn, K.S.; Sethi, G.; Chao, T.H.; Neuteboom, S.T.; Chaturvedi, M.M.; Palladino, M.A.; Younes, A.; Aggarwal, B.B. Salinosporamide A (NPI-0052) potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through down-modulation of NF- κ B regulated gene products. *Blood*, **2007**, *110*, 2286-2295.
- [72] Ruiz, S.; Krupnik, Y.; Keating, M.; Chandra, J.; Palladino, M.; McConkey, D. The proteasome inhibitor NPI-0052 is a more effective inducer of apoptosis than bortezomib in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, *5*, 1836-1843.
- [73] Cusack, J.C., Jr.; Liu, R.; Xia, L.; Chao, T.H.; Pien, C.; Niu, W.; Palombella, V.J.; Neuteboom, S.T.; Palladino, M.A. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer model. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 6758-6764.
- [74] Xu, W.S.; Parmigiani, R.B.; Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, **2007**, *26*, 5541-5552.
- [75] Mack, G.S. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2006**, *144*, 1443-1444.
- [76] Petrella, A.; D'Acunto, C.W.; Rodriguez, M.; Festa, M.; Tosco, A.; Bruno, I.; Terracciano, S.; Taddei, M.; Paloma, L.G.; Parente, L. Effects of FR25222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur. J. Cancer*, **2008**, *44*, 740-749.
- [77] Garcia-Manero, G.; Assouline, S.; Cortes, J.; Estrov, Z.; Kantarjian, H.; Yang, H.; Newsome, W.M.; Miller, W.H., Jr.; Rousseau, C.; Kalita, A.; Bonfils, C.; Dubay, M.; Patterson, T.A.; Li, Z.; Besterman, J.M.; Reid, G.; Laille, E.; Martell, R.E.; Minden, M. Phase I study of the oral isotype specific histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in leukemia. *Blood*, **2008**, *112*, 981-989.
- [78] Minucci, S.; Nervi, C.; Lo Coco, F.; Pelicci, P.G. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene*, **2001**, *20*, 3110-3115.
- [79] Bradbury, C.A.; Khanim, F.L.; Hayden, R.; Bunce, C.M.; White, D.A.; Drayson, M.T.; Craddock, C.; Turner, B.M. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, **2005**, *19*, 1751-1759.
- [80] Glazak, M.A.; Seto, E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, **2007**, *26*, 5420-5432.
- [81] Yang, X.-J.; Seto, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, **2007**, *26*, 5310-5318.
- [82] Rasheed, W.K.; Johnstone, R.W.; Prince, H.M. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2007**, *16*, 659-678.
- [83] Dokmanovic, M.; Clarke, C.; Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.*, **2007**, *5*, 981-989.
- [84] Marks, P.A.; Breslow, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.*, **2007**, *25*, 84-90.
- [85] Glaser, K.B. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, *74*, 659-671.
- [86] Ocker, M.; Schneider-Stock, R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, *39*, 1367-1374.
- [87] Im, J.Y.; Park, H.; Kang, K.W.; Choi, W.S.; Kim, H.S. Modulation of cell cycles and apoptosis by apicidin in estrogen receptor (ER)-positive and-negative human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, *172*, 235-244.
- [88] Shin, H.J.; Baek, K.H.; Jeon, A.H.; Kim, S.J.; Jang, K.L.; Sung, Y.C.; Kim, C.M.; Lee, C.W. Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation. *Oncogene*, **2003**, *22*, 3853-3858.
- [89] Dowling, M.; Voong, K.R.; Kim, M.; Keutmann, M.K.; Harris, E.; Kao, G.D. Mitotic spindle checkpoint inactivation by trichostatin A defines a mechanism for increasing cancer cell killing by microtubule-disrupting agents. *Cancer Biol. Ther.*, **2005**, *4*, 197-206.
- [90] Ruefli, A.A.; Ausserlechner, M.J.; Bernhard, D.; Sutton, V.R.; Tainton, K.M.; Kofler, R.; Smyth, M.J.; Johnstone, R.W. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 10833-10838.
- [91] Henderson, C.; Mizuau, M.; Paroni, G.; Maestro, R.; Schneider, C.; Brancolini, C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 12579-12589.
- [92] Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **1998**, *94*, 481-490.
- [93] Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.J.; Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **1998**, *94*, 491-501.
- [94] Rosato, R.R.; Almenara, J.A.; Dai, Y.; Grant, S. Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, *2*, 1273-1284.
- [95] Kim, H.R.; Kim, E.J.; Yang, S.H.; Jeong, E.T.; Park, C.; Lee, J.H.; Youn, M.J.; So, H.S.; Park, R. Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway? *Exp. Mol. Med.*, **2006**, *38*, 616-624.
- [96] Gillenwater, A.M.; Zhong, M.; Lotan, R. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, *6*, 2967-2975.
- [97] Dai, Y.; Rahmani, M.; Dent, P.; Grant, S. Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF- κ B activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol. Cell Biol.*, **2005**, *25*, 5429-5444.
- [98] Ling, Y.-H.; Liebes, L.; Ng, B.; Buckley, M.; Elliott, P.J.; Adams, J.; Jiang, J.-D.; Muggia, F.M.; Perez-Soler, R. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G₂-M phase arrest and apoptosis. *Mol. Cancer Ther.*, **2002**, *1*, 841-849.
- [99] Pei, X.-Y.; Dai, Y.; Grant, S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 3839-3852.
- [100] Nawrocki, S.T.; Carew, J.S.; Pino, M.S.; Highshaw, R.A.; Andbacka, R.H.; Dunner, K., Jr.; Pal, A.; Bornmann, W.G.; Chiao, P.J.; Huang, P.; Xiong, H.; Abbruzzese, J.L.; McConkey, D.J. Aggresome disruption: a novel strategy to enhance bortezomib-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, **2006**, *66*, 3773-3781.
- [101] Hideshima, T.; Bradner, J.E.; Wong, J.; Chauhan, D.; Richardson, P.; Schreiber, S.L.; Anderson, K.C. Small-molecule inhibition of

- proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 8567-8572.
- [102] Cortes, J.; Thomas, D.; Koller, C.; Giles, F.; Estey, E.; Faderl, S.; Garcia-Manero, G.; McConkey, D.; Ruiz, S.L.; Guercioli, R.; Wright, J.; Kantarjian, H. Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 3371-3376.
- [103] Orlowski, R.Z.; Voorhees, P.M.; Garcia, R.A.; Hall, M.D.; Kudrik, F.J.; Allred, T.; Johri, A.R.; Jones, P.E.; Ivanova, A.; Van Deventer, H.W.; Gabriel, D.A.; Shea, T.C.; Mitchell, B.S.; Adams, J.; Esseltine, D.L.; Trehu, E.G.; Green, M.; Lehman, M.J.; Natoli, S.; Collins, J.M.; Lindley, C.M.; Dees, E.C. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood*, **2005**, *105*, 3058-3065.
- [104] Attar, E.C.; De Angelo, D.J.; Supko, J.G.; D'Amato, F.; Zahrich, D.; Sirulnik, A.; Wadleigh, M.; Ballen, K.K.; McAfee, S.; Miller, K.B.; Levine, J.; Galinsky, I.; Trehu, E.G.; Schenkein, D.; Neuberg, D.; Stone, R.M.; Amrein, P.C. Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 1446-1454.
- [105] Suárez, L.; Vidrales, M.B.; García-Laraña, J.; Sanz, G.; Moreno, M.J.; López, A.; Barrena, S.; Martínez, R.; Tormo, M.; Palomera, L.; Lavilla, E.; López-Berges, M.C.; de Santiago, M.; de Equiza, M.E.; Miguel, J.F.; Orfao, A. CD34+ cells from acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and normal bone marrow display different apoptosis and drug resistance-associated phenotypes. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 7599-7606.
- [106] Suárez, L.; Vidrales, M.B.; Moreno, M.J.; López, A.; García-Laraña, J.; Pérez-López, C.; Tormo, M.; Lavilla, E.; López-Berges, M.C.; de Santiago, M.; San Miguel, J.F.; Orfao, A. PETHEMA Cooperative Group. Differences in anti-apoptotic and multidrug resistance phenotypes in elderly and young acute myeloid leukemia patients are related to the maturation of blast cells. *Haematologica*, **2005**, *90*, 54-59.
- [107] Colado, E.; Alvarez-Fernández, S.; Maiso, P.; Martín-Sánchez, J.; Vidrales, M.B.; Garayoa, M.; Ocio, E.M.; Montero, J.C.; Pandiella, A.; San Miguel, J.F. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica*, **2008**, *93*, 57-66.
- [108] Gil, L.; Styczynski, J.; Dytfield, D.; Debski, R.; Kazmierczak, M.; Kolodziej, B.; Rafinska, B.; Kubicka, M.; Nowicki, A.; Komarnicki, M.; Wysocki, M. Activity of bortezomib in adult de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Anticancer Res.*, **2007**, *27*, 4021-4025.
- [109] Riccioni, R.; Senese, M.; Diverio, D.; Riti, V.; Buffolino, S.; Mariani, G.; Boe, A.; Cedrone, M.; Lo-Coco, F.; Foà, R.; Peschle, C.; Testa, U. M4 and M5 acute myeloid leukaemias display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis. *Br. J. Haematol.*, **2007**, *139*, 194-205.
- [110] Minderman, H.; Zhou, Y.; O'Loughlin, K.L.; Baer, M.R. Bortezomib activity and *in vitro* interactions with anthracyclines and cytarabine in acute myeloid leukemia cells are independent of multidrug resistance mechanisms and p53 status. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2007**, *60*, 245-255.
- [111] Stappes, C.; Rynningen, A.; Hatfield, K.; Oyan, A.M.; Eide, G.E.; Corbascio, M.; Kalland, K.H.; Gjertsen, B.T.; Bruserud, Ø. Functional characteristics and gene expression profiles of primary acute myeloid leukaemia cells identify patient subgroups that differ in susceptibility to histone deacetylase inhibitors. *Int. J. Oncol.*, **2007**, *31*, 1529-1538.
- [112] Rynningen, A.; Bruserud, Ø. Epigenetic targeting in acute myeloid leukemia: use of flow cytometry in monitoring therapeutic effects. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2007**, *8*, 401-411.
- [113] Rynningen, A.; Stappes, C.; Bruserud, Ø. Clonogenic acute myelogenous leukemia cells are heterogeneous with regard to regulation of differentiation and effect of epigenetic pharmacological targeting. *Leuk. Res.*, **2007**, *31*, 1303-1313.
- [114] Suthesophon, K.; Kobayashi, Y.; Takatoku, M.A.; Ozawa, K.; Kano, Y.; Ishii, H.; Furukawa, Y. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) induces apoptosis in leukemic cells by facilitating mitochondrial translocation of Bax, which is enhanced by the proteasome inhibitor bortezomib. *Acta Haematol.*, **2006**, *115*, 78-90.
- [115] Conticello, C.; Adamo, L.; Vicari, L.; Giuffrida, R.; Iannolo, G.; Anastasi, G.; Caruso, L.; Moschetti, G.; Cupri, A.; Palumbo, G.A.; Gulisano, M.; De Maria, R.; Giustolisi, R.; Di Raimondo, F. Antitumor activity of bortezomib alone and in combination with Trail in human acute myeloid leukemia. *Acta Haematol.*, **2008**, *120*, 19-30.
- [116] Fuchs, O.; Provaznikova, D.; Marinov, I.; Kuzelova, K.; Spicka, I. The proteasome inhibitor bortezomib as better inducer of apoptosis than transforming growth factor beta in human acute myeloid cell lines. *FEBS J.*, **2008**, *275*(Suppl. 1), 305, Abstract PP7A-24.
- [117] Gatto, S.; Scappini, B.; Pham, L.; Onida, F.; Milella, M.; Ball, G.; Ricci, C.; Divoky, V.; Verstovsek, S.; Kantarjian, H.M.; Keating, M.J.; Cortes-Franco, J.E.; Beran, M. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica*, **2003**, *88*, 853-863.
- [118] Yu, C.; Rahmani, M.; Conrad, D.; Subler, M.; Dent, P.; Grant, S. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to ST1571. *Blood*, **2003**, *102*, 3765-3774.
- [119] Dai, Y.; Rahmani, M.; Pei, X.Y.; Dent, P.; Grant, S. Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood*, **2004**, *104*, 509-518.
- [120] Pahl, J.C.; Ruiz, S.; Niemi, I.; Calvert, L.R.; Andreeff, M.; Keating, M.; Faderl, S.; McConkey, D.J. Effects of the proteasome inhibitor, bortezomib, on apoptosis in isolated lymphocytes obtained from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*, 4570-4577.
- [121] Kelley, T.W.; Alkan, S.; Skralovic, G.; Hsi, E.D. Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk. Res.*, **2004**, *28*, 845-850.
- [122] Duechler, M.; Linke, A.; Cebula, B.; Shehata, M.; Schwarzmeier, J.D.; Robak, T.; Smolewski, P. *In vitro* cytotoxic effect of proteasome inhibitor bortezomib in combination with purine nucleoside analogues on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Eur. J. Haematol.*, **2005**, *74*, 407-417.
- [123] Kabore, A.F.; Sun, J.; Hu, X.; McCrea, K.; Johnston, J.B.; Gibson, S.B. The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis*, **2006**, *11*, 1175-1193.
- [124] Ruiz, S.; Krupnik, Y.; Keating, M.; Chandra, J.; Palladino, M.; McConkey, D. The proteasome inhibitor NPI-0052 is a more effective inducer of apoptosis than bortezomib in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mol. Cancer Ther.*, **2006**, *5*, 1836-1843.
- [125] Dai, Y.; Chen, S.; Kramer, L.B.; Funk, V.L.; Dent, P.; Grant, S. Interactions between bortezomib and romidepsin and belinostat in chronic lymphocytic leukemia cells. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 549-558.
- [126] Tan, C.; Waldmann, T.A. Proteasome inhibitor PS-341, a potential therapeutic agent for adult T-cell leukemia. *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 1083-1086.
- [127] Satou, Y.; Nosaka, K.; Koya, Y.; Yasunaga, J.I.; Toyokuni, S.; Matsuo, M. Proteasome inhibitor, bortezomib, potentially inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both *in vivo* and *in vitro*. *Leukemia*, **2004**, *18*, 1357-1363.
- [128] Nasr, R.; El-Sabban, M.E.; Karam, J.A.; Dbaibo, G.; Kfoury, Y.; Arnulf, B.; Lepelletier, Y.; Bex, F.; de Thé, H.; Hermine, O.; Bazarbachi, A. Efficacy and mechanism of action of the proteasome inhibitor PS-341 in T-cell lymphomas and HTLV-I associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*, **2005**, *24*, 419-430.
- [129] Hamamura, R.S.; Ohyashiki, J.H.; Kurashina, R.; Kobayashi, C.; Zhang, Y.; Takaku, T.; Ohyashiki, K. Induction of heme oxygenase-1 by cobalt protoporphyrin enhances the antitumor effect of bortezomib in adult T-cell leukaemia cells. *Br. J. Cancer*, **2007**, *97*, 1099-1105.

- [130] Ozpuyan, F.; Meyer, P.; Ni, H.; Al-Masri, H.; Alkan, S. Bortezomib induces apoptosis in T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL). *Leuk. Lymphoma*, **2007**, *48*, 2247-2250.
- [131] Ishitsuka, K.; Tamura, K. Treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma: past, present, and future. *Eur. J. Haematol.*, **2008**, *80*, 185-196.
- [132] Kraus, M.; Rückrich, T.; Reich, M.; Gogel, J.; Beck, A.; Kammer, W.; Berkers, C.R.; Burg, D.; Overkleef, H.; Ovaa, H.; Driessen, C. Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells. *Leukemia*, **2007**, *21*, 84-92.
- [133] Oerlemans, R.; Franke, N.E.; Assaraf, Y.G.; Cloos, J.; van Zantwijk, I.; Berkers, C.R.; Scheffer, G.L.; Debipersad, K.; Vojtekova, K.; Lemos, C.; van der Heijden, J.W.; Ylstra, B.; Peters, G.J.; Kaspers, G.L.; Dijkmans, B.A.; Scheper, R.J.; Jansen, G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, **2008**, *112*, 2489-2499.
- [134] Vink, J.; Cloos, J.; Kaspers, G.J. Proteasome inhibition as novel treatment strategy in leukaemia. *Br. J. Haematol.*, **2006**, *134*, 253-262.
- [135] McCloskey, S.M.; McMullin, M.F.; Walker, B.; Irvine, A.E. The therapeutic potential of the proteasome in leukaemia. *Hematol. Oncol.*, **2008**, *26*, 73-81.
- [136] Sun, K.; Welniak, L.A.; Panoskaltis-Mortari, A.; O'Shaughnessy, M.J.; Liu, H.; Barao, I.; Riordan, W.; Sitcheran, R.; Wysocki, C.; Serody, J.S.; Blazar, B.R.; Sayers, T.J.; Murphy, W.J. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 8120-8125.
- [137] Sun, K.; Wilkins, D.E.; Anver, M.R.; Sayers, T.J.; Panoskaltis-Mortari, A.; Blazar, B.R.; Welniak, L.A.; Murphy, W.J. Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft-versus-host disease (GVHD): delayed administration of bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity. *Blood*, **2005**, *106*, 3293-3299.

Received: 01 June, 2008

Revised: 30 June, 2008

Accepted: 23 December, 2008

Unusual 80 months long survival of a 67-year-old patient with near-tetraploid acute myeloid leukemia M0, ERG overexpression and without erythroblastic and megakaryocytic dysplasia. Lemež P., Klamová H., Zemanová Z., Marinov I., Fuchs O., Schwarz J., Březinová J., Provazníková D., Kostečka A., Marková J., Michalová K., Jelínek J. přijato do Acta Haematologica 2011, v tisku

Unusual 80 months long survival of 67-year-old patient with near-tetraploid acute myeloid leukemia M0, ERG overexpression and without erythroblastic and megakaryocytic dysplasia

Petr Lemež^{1,2,*}, Hana Klamová², Zuzana Zemanová³, Iuri Marinov², Ota Fuchs², Jiří Schwarz², Jana Březinová², Dana Provazníková², Arnošt Kostečka², Jana Marková², Kyra Michalová³, Jaroslav Jelínek^{2,4}

¹Department of Hematology-Blood Transfusion, Hospital Jihlava, Jihlava, Czech Republic,

²Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic,

³Center of Oncocytogenetics, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General University Hospital and First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic,

⁴Present address: Department of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA.

Corresponding author: Petr Lemež, M.D., Ph.D.

Department of Hematology-Blood Transfusion,

Hospital Jihlava,

Vrchlickeho 59,

586 33 Jihlava, Czech Republic

plemez@post.cz, phone +420 604 866 499, fax +420 220 511 037

Short title: Long survival in near-tetraploid acute myeloid leukemia

Abstract.

Patients with near-tetraploid acute myeloid leukemia (NT-AML) typically have a poor survival. We present the case of 67-year-old Caucasian male with NT-AML M0 who had an unusually long first complete remission of 51 months and overall survival 80 months. The only characteristic distinguishing him from other previously described patients with NT-AML was the absence of erythroblastic and/or megakaryocytic dysplasia (EMD) at diagnosis. Molecular-genetic testing for AML fusion transcripts associated with favorable prognosis (PML/RAR α , AML1/ETO, CBF β /MYH11) were negative, as were other prognostic markers like MLL-PTD, FLT3-ITD, or mutations of FLT3-D835, NPM1 or CEBPA. Expression studies of ERG, MN1 and EVI1 revealed overexpression of ERG only. The absence of EMD may be a useful prognostic/diagnostic feature of this new rare subtype of NT-AML.

Key words: acute myeloid leukemia, tetraploidy, polyploidy, multi-lineage dysplasia, diagnosis, chemotherapy, prognosis

The European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) reported 25 patients with rarely occurring near-tetraploid acute myeloid leukemias (NT-AML). They showed that these patients exhibited erythroblastic and/or megakaryocytic dysplasia (EMD) in bone marrow smears and had a poor overall survival after chemotherapy with a median of 4 (range: 0.1-32) months [1]. Other smaller series of NT-AML cases showed a similarly poor survival with the longest one being 41 months after chemotherapy alone [2-7]. The only exceptions are the patients with acute promyelocytic leukemia with tetraploid clones (NT-AML M3) who may experience long-term survival after all-trans retinoic acid (ATRA) combined with chemotherapy [8].

Here we report on a 67-year-old male with NT-AML M0 and the unusually long 1st complete remission (CR) duration and overall survival, 51 and 80 months, respectively. We present detailed characteristics of his leukemic cells and of their clonal development.

Patient and Methods

The diagnosis of AML M0 was established according to the FAB criteria [9]. Standard morphological examinations for dysplastic features, cytochemical, flow cytometry (FCM), and granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) examinations of bone marrow cells at diagnosis and during the course of the disease were performed as described previously [3, 10].

Conventional G-banded chromosomal analysis was carried out on bone marrow samples cultivated for 24 hours in RPMI 1640 medium with 10 % of fetal calf serum without mitogen stimulation. Chromosomal preparations were made according to standard techniques using colcemide, hypotonic treatment, fixation in methanol/acetic acid and G-banding with Wright stain. Karyotypes were described according to the International System of Human Cytogenetic Nomenclature [11].

Interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH) using the locus specific probes (LSI) for RB1 and AML1 genes (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) was performed to confirm the trisomy/tetrasomy of chromosomes 13 and 21, respectively. Cells were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). For hybridization and post-hybridization washes, the manufacturer's protocols were followed. All available mitoses and 200 interphase nuclei were analyzed using an Axioplan 2 Imaging microscope (Zeiss) equipped with computer analysis system (ISIS, MetaSystems).

Molecular-genetic analyses were performed only on cDNA obtained by reverse transcription of RNA isolated from the bone marrow mononuclear cells cryopreserved at diagnosis. The presence of fusion transcripts PML/RAR α , AML1/ETO, and CBF β /MYH11 was analysed

using single-step PCR and 2 % agarose gel electrophoresis as described previously [12]. The same applies also to the detection of the ITD in JM domain of the FLT3 gene. The D835 mutations in the FLT3 TK domain were detected using EcoRV restriction analysis of PCR products. All the primers used were described in detail elsewhere [12, 13]. Furthermore, we examined the presence of mutations in the CEBPA [14] and NPM1 [15] genes and of intragenic MLL abnormalities such as partial tandem duplications (MLL-PTD) by direct sequencing [16, 17]. The expression of the ETS-related gene ERG [18], MN1 [19] and EVI1 [20] genes was evaluated using real-time PCR using SYBR Green Jumpstart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich). Values for ERG, MN1 and EVI1 expression were normalized against that of the GAPDH control gene. More than 5.0 fold upregulated gene expression in comparison with the median values of its expression in mononuclear cells isolated from the bone marrow of healthy age-matched individuals was marked as overexpression.

Case report

A 67-year-old male presented with progressive weakness of 6-week-duration and increased temperature in last few days to hematology clinic on October 12, 1995 (Table 1). He was transferred as de novo AML to the Institute of Hematology and Blood Transfusion (IHBT) in Prague, because of changes in his complete blood count (CBC) that were absent 10 weeks earlier. Blood chemistry showed increased LDH 46 (normal up to 8.6) μ kat/L, CRP 72 (10) mg/L, borderline AST and bilirubin. Somatic examination was normal.

Hematological examinations led to the diagnosis of NT-AML M0 because of bone marrow infiltration with 93.6 % undifferentiated blasts (Table 1) when 26 % of them were very large ones with a diameter larger than 3 erythrocytes (NT-blasts, Fig. 1). They had a high nucleocytoplasmic ratio, round to slightly irregular nuclei with 1-7 nucleoli, basophilic cytoplasm without granules and with single or more vacuoles in 48 % of them. Dysplastic changes [5, 10, 21] were found only in 11 % erythroblasts (Fig. 2), 24 % neutrophils and only one of 4 megakaryocytes; all these changes were below the limits for the diagnosis of lineage dysplasia in any lineage [21, 22]. Cytochemical examinations revealed that blasts were negative for peroxidase and alpha-naphthyl butyrate esterase. Immunophenotyping of the blasts showed positivity for CD34, HLA-DR and myeloid-lineage associated antigens CD11b, CD13, CD15, CD33, and negativity for CD14, glycophorin A, and lymphoid markers: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, and CD22. The expression of myeloperoxidase antigen in blasts was not tested by FCM. Cytogenetic examinations of two different specimens of the bone marrow at diagnosis proved a near-tetraploid karyotype with various gains in most metaphases and 20-40% of normal metaphases (Table 1). Growth of granulocyte-macrophage

colonies and clusters (CFU-GM) was low at diagnosis (Table 1). Molecular-genetic analyses of diagnostic bone marrow leukemic blasts for the presence of PML/RAR α , AML1/ETO, CBF β /MYH11 as well as for FLT3 (both ITD and the D835 mutation), CEBPA and NPM1 genes mutations or MLL-PTD gave negative results. Only ERG overexpression was found with the 9-fold increase of ERG mRNA/GAPDH mRNA in comparison with age-matched healthy controls while MN1 and EVI1 expression was normal.

Chemotherapy 3/7 with daunorubicin (DNR) 45 mg/m²/day i.v. on days 1, 3, and 5, plus cytosine arabinoside (Ara-C) 100 mg/m²/3-hour infusion i.v. every 12 hours for 7 days [21] was started on October 17 and induced CR as proved with CBC and cytological, FCM, cytogenetic, and CFU-GM bone marrow examinations on November 14 (Table 1). The 2nd cycle 3/7 was initiated on November 17, and the 3rd on January 21, 1996. It was followed by a long neutropenia and severe mycotic bronchopneumonia. Although it was finally successfully treated but prevented further administration of chemotherapy. Immunotherapy with interleukin-2 (IL-2) was considered an option to prolong CR duration..Thus he started the first cycle with IL-2 0.2 x 10⁶ IU/m² b.i.d. s.c. for 21 days since May 28, 1966. Further four IL-2 cycles were given since August 14, 1996 to March 19, 1997. He remained in CR with for 51 months with normal CBC and normal bone marrow findings – the last one in October 1999.

In February 2000 he became tired and weak due to anemia as a part of pancytopenia (Table 1). Bone marrow examination showed a relapse of AML with 44 % of blasts with a change of the leukemic clone. The bone marrow blasts partially matured to promyelocytes, myelocytes and atypical neutrophils (75 % dysplastic - DysG) and a part of them had azurophilic granules. Dysplasia of erythroblasts (42 %) above the 25 % limit was found [21-22]. The growth of CFU-GM has changed to the low numbers of colonies and high numbers of clusters – the so called “leukemic type” of CFU-GM growth (Table 1). About 9 % of cells were large NT-blasts roughly corresponding to the minority of the NT-metaphases (5/27) and 17 % and 20 % tetraploid interphase nuclei found by I-FISH with RB1 and AML1 probes, respectively.

The reinduction chemotherapy miniIDIA with Ara-C 500 mg/m²/3-hour infusion every 12 hours for 8 doses and idarubicin 10 mg/m² on days 4 and 5 was started on March 7, 2000. It caused prolonged neutropenia complicated with a mycotic bronchopneumonia treated with anti-mycotic therapy and G-CSF. He achieved a hematological partial remission with persisting NT-metaphases. Additionally, two new karyotypic clones not detected by FISH methods in the diagnostic specimens were found: 47,XY,+21, and 47,XY,+13 (Table 1). On

May 17, 2000, the 2nd cycle miniIDIA was started that led to normal CBC without further complications. In October 2000 a drop of platelets to $66 \times 10^9/L$ was noted and a further CBC deterioration on November 23, 2000, with platelets $46 \times 10^9/L$ and Hb 113 g/L. Another cycle of IL-2 was initiated.

The 2nd relapse of AML with 38 % bone marrow blasts and lower expression of CD34 (7 %) was diagnosed on January 24, 2001 (Table 1). The morphology of the blood leukemic cells had changed to abnormal maturation in the neutrophilic and monocytic lineage. The differential of peripheral blood leucocytes showed 50-75 % abnormal mostly mature neutrophilic cells, 15-31 % monocytoid cells, and 1-18 % blasts. In the bone marrow similar morphological changes were found. Trilineage dysplasia was present. The disease resembled rather a chronic (or subacute, with increased numbers of blasts) myelomonocytic leukemia with high numbers of CFU-GM capable of colony formation in vitro at this phase (Table 1). Trisomy 13 prevailed as the only abnormal karyotypic clone at the 2nd relapse.

The patient opted for therapy with mercaptopurine (Mp) 50 mg tablet every other day as an outpatient and since June 2001 with 75-100 mg of Mp a day till March 2002. His CBC was satisfactory without any need for transfusions. His good clinical status showed a slow progressive worsening (tiredness, infections) from October 2001. Since March 2002 his AML became refractory to Mp and he became red cell transfusions dependent. He did not respond to hydroxyurea 1000 mg/day. In May 2002 palliative therapy with Ara-C 100 mg/m²/day in continuous infusion for 5 days and one dose of idarubicin 8 mg/m² was administered for WBC $153 \times 10^9/L$ but it caused only a few weeks lasting WBC decrease. He died of AML progression, terminal respiratory insufficiency and hemorrhagic diathesis on June 26, 2002. An autopsy was denied.

Tab.1. Blood and bone marrow findings at diagnosis and during the course of AML

Date	Clinical status	Blood				Bone marrow						Karyotype	CFU-GM	
		Hb	WBC	Blasts	Plts	Blasts	Erybl	DysE	DysMg	DysG	CD34		colonies	clusters
		g/L	10 ⁹ /L	%	10 ⁹ /L	%	%	%	%	%	%			
12.10.95	Dg.	139	52.9	ND	108	85.0	2.0	11	1/4	24	72	92~95<4n>,XXYY,inc [cp19]/46,XY[5]	1	3 low
16.10.95	"	140	62.4	73	67	93.6	0.4				ND	92~95<4n>,XXYY,inc[cp12]/46,XY[8]	6	4 low
14.11.95	1st CR	116	5.9	0	427	3.3	20.0				ND	46,XY[20]	120	155 norm
04.04.96	"	133	6.2	0	224	2.0	41.2				3.5	46,XY[20]	18	25 bord
19.05.99	"	151	6.4	0	149	2.0	17.2				2	46,XY[20]	85	55 norm
22.02.00	1st rel.	75	2.9	0	58	44.0	9.8	42	1/2	80	34	92<4n>,XXYY[5]/46,XY[22]	10	261 leuk
02.05.00	PR	105	7.5	1	236	8.0	19.5				ND	47,XY,+21[11]/47,XY,+13[2]/92<4n>,XXYY[2]/46,XY[11]	44	171 bord
24.01.01	2nd rel.	116	10.8	1	24	38.0	13.5	40	9/12	74	7	47,XY,+13[20]	307	200 high
26.06.01	"	127	18.2	9	65	10.2	4.5				ND	47,XY,+13[12]	149	252 high
28.11.01	"	104	20.8	11	40	18.0	6.0				2	47,XY,+13[20]	476	446 high
06.05.02	"	84	153.3	17	44	23.6	0				16	47,XY,+13[22]		ND
24.06.02	Exitus	88	189.8	17	18									

Blasts - blasts, promyelocytes, and promonocytes. Erybl - erythroblasts. DysE - dysplastic erythroblasts, DysMg - number of dysplastic/total number of examined megakaryocytes. DysG - dysplastic granulocytes. CR - complete remission, PR - partial remission, rel. - relapse. CFU-GM: numbers of colonies (normal 20-150) and clusters (normal 20-150)/10⁵ seeded nucleated cells. Bord - borderline. ND - not done.

Discussion

We report an elderly patient with NT-AML M0 and unexpectedly long survival of 80 months. Only patients with NT-AML M3 might be associated with such a long survival [8] but the undifferentiated morphology of leukemic cells contradicted AML M3. Furthermore, PML/RARA fusion transcripts were not found in the case. Many features of this patient like morphology, CD34 expression, low growth of CFU-GM, and higher age corresponded to NT-AML most frequently found in European patients [1, 5] but his bone marrow cells did not exhibit EMD. It seems that the absence of EMD was associated with his longer unexpected survival. The absence of EMD was associated with a good response to 3+7 standard dose chemotherapy and better survival in AML patients with karyotypes associated with an intermediate prognosis [21-24], with normal karyotypes in AML patients under 65 years of age [25] or even above 80 years of age [26].

Molecular-genetic analyses of leukemic blasts did not reveal any molecular marker associated with a favorable prognosis as CEBPA or NPM1 mutations. The only adverse molecular marker detected was the overexpression of ERG gene in his leukemic blasts. That had been

previously associated with a worse prognosis in patients with AML and a complex or normal karyotype [18, 27] but it may only reflect his immature M0 type of AML [18].

If administration of low-doses of IL-2 contributed to a longer 1st CR in our patient remains unclear but a low dose IL-2 regimen in patients over 60 years old with AML in 1st CR did not improve CR duration or overall survival in the largest published study [28].

Another interesting finding was the clonal selection and development during the course of disease as proved by cytogenetic, morphological, FCM, and CFU-GM findings.

At diagnosis only 26 % of blasts were the morphologically large NT-blasts with a growth advantage in the cytogenetic culture media and the majority of the leukemic blasts on smears were of the smaller size with a probable karyotype in the near-diploid range. Such findings are typical for NT-AML at diagnosis [1, 3, 5] and point to genetic diversity of genetically-distinct leukemia-initiating cell subclones [29, 30]. Normal karyotype, normal growth of CFU-GM with normal morphological and FCM results were found in complete remission. Only a minority of metaphases showed near-tetraploid karyotype at the first relapse.

Morphological changes of blasts and dysplastic features in the granulocytic and erythroblastic lineages pointed to clonal selection of a different NT-subclone.,with a different type of the CFU-GM growth, too...At the partial remission after the first reinduction chemotherapy three abnormal clones were found of which two newly appeared (Table 1). The new cell clone with trisomy 21 was found only at this examination.The clone with trisomy 13 later prevailed as the only abnormal karyotypic clone at the 2nd relapse and persisted till the death of the patient. FISH studies performed on bone marrow cells cryopreserved at diagnosis did not prove the presence of a cell clone with trisomy of chromosome 13 or 21, At the 2nd relapse the change of karyotype was again associated with changes in leukemic cells morphology, phenotype and CFU-GM growth. Causes of these clonal changes remained unclear but they might be usual as proposed by the multi-clonal evolution model of leukemogenesis [29, 30], especially in NT-AML.The administered chemotherapy might have contributed to them.

Trisomy 13 became the only abnormal clone at the 2nd relapse. It is interesting that tetrasomy 13 was associated with near-tetraploid metaphases and AML M0 in two elderly patients; trisomy 13 with monosomy 21 in another 74-year-old lady with NT-metaphases and AML M0 [31]. The survival of these 3 patients was not reported. Another case with NT-AML M7 plus two extra chromosomes 13 and EMD has been described [1].

The absence of EMD is a typical feature of AML M3 [21], another type of NT-AML associated with a favorable survival [8]. The frequency of NT-AML is about or below 1 % of all AML [6]. We diagnosed and treated 5 patients with NT-AML among approximately 500

patients with primary or secondary AML at IHBT, Prague, between 1981 and 2000 [3, 5]. Four of them exhibited EMD and had a poor survival. This case was the only one without EMD and had a prolonged survival. That points to the rare occurrence of this subtype in about 0.1-0.2 % of all AML. Similar cases of NT-AML without EMD may shed more light on this very rare subtype including prognosis and associated molecular changes.

Acknowledgments

We thank Mrs. Eva Mikulová and Eva Podzimeková for their excellent technical assistance and help with cryopreserved cells.

This work was supported in part by grants No.1912-4 from IGA MH CR, MSM0021620808, and MZOVFN2005.

References

1. Béné MC, Castoldi G, Derolf A, Garand R, Haas T, Haferlach T, Knapp W, Kuhlein E, Lemež P, Ludwig WD, Marinov I, Matutes E, Michalová K, Porwit-MacDonald A, Orfao A, Schoch C, Talmant P, Van't Veer MB, Zemanová Z, Zühlsdorf M: Near-tetraploid acute myeloid leukemias: an EGIL retrospective study of 25 cases. *Leukemia* 2006;20:725-728.
2. Borgström GH, Vuopio P, de la Chapelle A: Polyploidy of the bone marrow. *Scand J Haematol* 1976;17:123-131.
3. Lemež P., Jelínek J., Michalová K., Koubek, K., Schwarz, J., Malasková, V., Rypáčková, B., Jirásek, A., Březinová, J., Hrabánek, J., Vítek: A. Near-tetraploid poorly differentiated acute myeloid leukemia M0 diagnosed by short-term cultures with a phorbol ester TPA. *Leukemia Res* 1994;18:493-497.
4. Clarke MR, Lynch E.F., Contis LC, Sherer ME, Shekhter-Levin S: Near-tetraploidy in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;86:107-115.
5. Lemež P, Michalová K, Zemanová Z, Marinov I, Trpáková A, Moravcová J, Jelinek J: Three cases of near-tetraploid acute myeloid leukemias originating in pluripotent myeloid progenitors. *Leukemia Res* 1998;22:581-588.
6. Iyer RV, Sait SNJ, Matsui S-I, Block AW, Barcos M, Slack JL, Wetzler M, Baer MR: Massive hyperdiploidy and tetraploidy in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;148:29-34.
7. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, (eds), Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2010), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. Accessed on October 20, 2010.

8. Pan J, Xue Y, Qiu H, Wu Y, Wang Z, Zhang J, Shen J: Tetraploid clone characterized by two t(15;17) in five cases of acute promyelocytic leukemia (letter). *Cancer Genet Cytogenet* 2009;188:57-59.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991;78:325-329.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: Proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Br J Haemat* 1982;51:189-199.
11. Shaffer LG, Tommerup N (eds): *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, S. Karger, 2005.
12. Trnková Z, Bedrlíková R., Marková J, Michalová K, Stöckbauer P, Schwarz J: Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute leukemia. *Neoplasma* 2007;54:383-390.
13. Marková J, Trnková Z, Michková P, Maaloufová J, Starý J, Cetkovský P, Schwarz J: Monitoring of minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia and the impact of C-KIT, FLT3, and JAK2 mutations on clinical outcome. *Leuk Lymphoma* 2009;14:1448-1460.
14. Fuchs O, Provazníková D, Kočová M, Kostečka A, Cveková P, Neuwirtová R, Čermák J, Březinová J, Schwarz J, Marková J, Salaj P, Klamová H, Maaloufová J, Lemež P, Nováková L, Benešová K: CEBPA polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:401-405.
15. Pitiot AS, Santamaría I, García-Suárez O, Centeno I, Astudillo A, Rayón C, Balbín M: A new type of NPM1 gene mutation in AML leading to a C-terminal truncated protein. *Leukemia* 2007;21:1564-1566.
16. Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, Mrózek K, Arthur DC, Herzig GP, Baer MR, Schiffer CA, Heinonen K, Knuutila S, Nousiainen T, Ruutu T, Block AW, Schulman P, Pedersen-Bjergaard J, Croce CM, Bloomfield CD: Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11. *Cancer Res* 1996;56:1418-1425.
17. Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W, Chen YC, Wang CH, Shen MC, Lin DT, Lin KH, Tien HF: Clinical and biological implications of partial tandem

- duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia* 2002;16:196-202.
18. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Whitman SP, Kolitz JE, Edwards CG, Vardiman JW, Powell BL, Baer MR, Moore JO, Perrotti D, Caligiuri MA, Carroll AJ, Larson RA, de la Chapelle A, Bloomfield CD: Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005;23:9234-9242.
19. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Döhner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Ganser A: High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006;108:3898-3905.
20. Russell M, List A, Greenberg P, Woodward S, Glinsmann B, Parganas E, Ihle J, Taetle R: Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood* 1994;84:1243-1248.
21. Lemež P, Gálíková J, Haas T: Erythroblastic and/or megakaryocytic dysplasia in de novo acute myeloid leukemias M0-M5 show relation to myelodysplastic syndromes and delimit two main categories. *Leukemia Res* 2000;24:207-215.
22. Brito-Babapulle F, Catovsky D, Galton DAG: Clinical and laboratory features of de novo acute myeloid leukaemia with trilineage myelodysplasia. *Br J Haematol* 1987;66:445-450.
23. Estienne MH, Fenaux P, Preudhomme C, Lai JL, Zandecki M, Lepelley P, Cosson A: Prognostic value of dysmyelopoietic features in de novo acute myeloid leukaemia: a report on 132 patients. *Clin Lab Haematol* 1990;12:57-65.
24. Weinberg OK, Seetharam M, Ren L, Seo K, Ma L, Merker JD, Gotlib J, Zehnder JL, Arber DA: Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. *Blood* 2009;113:1906-1908.
25. Lemež P, Gálíková J, Haas T: Do de novo acute myeloid leukemias with normal cytogenetics involve two main prognostic categories distinguished by the presence of erythroblastic and/or megakaryocytic dysplasia? *Neoplasma* 2000;47:41-47.
26. Lemež P, Gálíková J, Michalová K, Dvořáková D, MacWhannell A, Zemanová Z, Stejskal J: Patients older than 80 years with de novo acute myeloid leukemias without erythroblastic and/or megakaryocytic dysplasia achieve complete remission and longer survival after classical chemotherapy 3+7. *Vnitr Lek* 2010;56:37-43.
27. Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrózek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, Ruppert AS, Mohamed N, Davuluri RV, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A: Acute myeloid

leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosomes 21: Amplification discloses overexpression of APF, ETS2, and ERG genes. PNAS 2004;101:3915-3920.

28. Baer MR, George SL, Caligiuri MA, Sanford BL, Bothun SM, Mrózek K, Kolitz JE, Powell BL, Moore JO, Stone RM, Anastasi J, Bloomfield CD, Larson RA: Low-dose interleukin-2 immunotherapy does not improve outcome of patients aged 60 years and older with acute myeloid leukaemia in first complete remission: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. J Clin Oncol 2008;26:4934-4939.

29. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Titley I, Swansbury J, Kearney L, Enver T, Greaves M: Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukemia. Nature 2011;469:356-361.

30. Notta F, Mullighan CG, Wang JC, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, Ma J, Minden MD, Downing JR, Dick JE: Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. Nature 2011;469:362-367.

31. Mehta AB, Bain BJ, Fitchett M, Shah S, Secker-Walker LM: Trisomy 13 and myeloid malignancy – characteristic blast cell morphology: a United Kingdom Cancer Cytogenetics Group survey. Br J Haematol 1998;101:749-752.

Fig.1. Seven leukemic blasts from the diagnostic bone marrow. Three blasts are large with large nuclei, i.e. near-tetraploid, the remaining smaller four have the DNA content and number of chromosomes in the near-diploid range. Blasts are unclassifiable by morphology with 2-7 nucleoli. One small vacuole is apparent in the cytoplasm of four blasts.

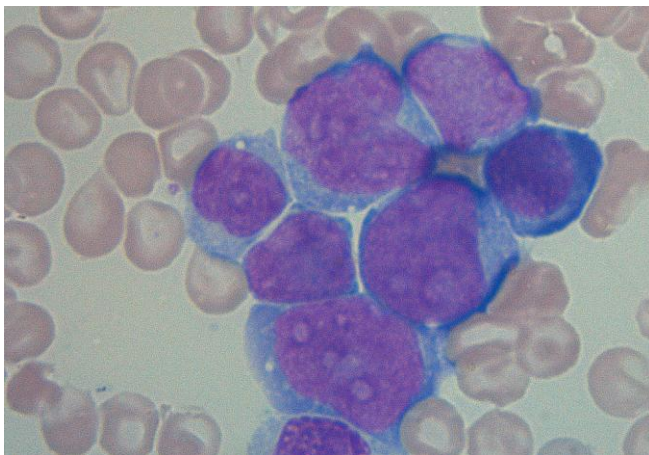
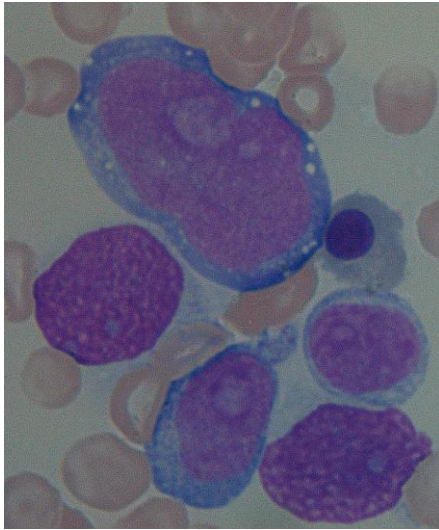


Fig.2. One very large (near-tetraploid) blast with many cytoplasmic vacuoles, two smaller blasts and two distorted blast nuclei. One erythroblast without dysplastic features.



Autoreferát

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Úloha TGF β a studium prognostických faktorů u pacientů s MDS a AML

Dana Provazníková

2011

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jiří Kraml, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfúze

Školitel: Ing. Ota Fuchs, CSc.

Konzultant (byl-li): -

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1. Úvod
2. Hypotézy a cíle práce
3. Materiál a metodika
4. Výsledky
5. Diskuse
6. Závěry
7. Použitá literatura

Abstrakt

Neprokázali jsme žádnou mutaci v kódujících oblastech genů signální dráhy TGFβ1, ale zjistili jsme sníženou nebo nedetekovatelnou expresi těchto analyzovaných genů. Snížená exprese je zřejmě způsobena epigenetickými změnami, tedy hypermetylací a deacetylací promotorových oblastí těchto genů. Antiproliferační a apoptotický účinek TGFβ1 byl testován na liniích AML (ML1, ML2, CTV1 a Kasumi1). Rezistence ML2 buněk k inhibici DNA syntézy pomocí TGFβ1 je způsobena jinými faktory než mutacemi genů signální dráhy TGFβ1. Zjistili jsme, že zvýšená exprese genu pro SnoN (Ski-like novel gene) na úrovni mRNA i proteinu je zřejmě důvodem této rezistence. Buňky linie Kasumi1 a ML2 byly citlivé k indukci apoptózy vyvolané působením TGFβ1, ale v menší míře než při působení inhibitoru proteazomu, bortezomibu. Rozdílnost odpovědí AML buněk jednotlivých linií odráží velkou heterogenitu akutní myeloidní leukémie (AML) u pacientů s AML. Analýza prognostických faktorů AML s normálním karyotypem potvrdila, že mutace genu *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) jsou příznivým prognostickým faktorem a naopak zvýšená exprese genů pro *EV11* ("Ecotropic Virus Integration Site 1") a *ERG* ("ETS-related gene") jsou nepříznivým prognostickým faktorem. *EV11* je také negativním markerem u myelodysplastického syndromu (MDS). Nepotvrdili jsme výnam zvýšené exprese genu *MN1* ("Meningioma 1") jako negativního prognostického faktoru.

Abstract

We did not find mutation in coding areas of genes for components of TGFbeta1 signaling pathway but we detected decreased or undetectable expression of these analysed genes. The decreased expression is probably caused by epigenetic changes, so by hypermethylation and

deacetylation of promoter regions of these genes. Antiproliferative and apoptotic effect of TGF β 1 was analysed in AML cell lines (ML1, ML2, CTV1 and Kasumi1). ML2 cells resistance to inhibition of DNA synthesis by TGF β 1 is not caused by mutations of genes for components of TGF β 1 signaling pathway. We found that increased *SnoN* (Ski-like novel gene) expression on the level of corresponding mRNA and protein is probably accountable for this resistance. Kasumi1 and M2 cells were sensitive to induction of apoptosis caused by TGF β 1 treatment but in less extent than by proteasome inhibitor bortezomib. The difference of AML cells of different lines answers shows a great heterogeneity AML in AML patients. Prognostic factors analysis in AML with normal karyotype confirmed that *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) mutations predict favourable prognosis but the elevated *EVII* ("Ecotropic Virus Integration Site 1") and *ERG* ("ETS-related gene") expression are connected with unfavourable prognosis. EVI1 is a negative marker for MDS as well. We did not confirm overexpression of *MNI* ("Meningioma 1") as a negative prognostic factor.

1. Úvod

Každá fáze buněčného cyklu (G1, S, G2 and M) je kontrolována určitými cyklin-dependentními kinázami (CDK) a jejich regulatorními podjednotkami cykliny. Tumor supresorová aktivita transformačního růstového faktoru beta (TGF β) závisí na jeho schopnosti regulovat expresi mnoha proteinů, jenž hrají klíčovou roli v kontrole buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze. TGF β je schopen způsobit zastavení buněčného růstu u mnoha různých typů buněk včetně epitelálních, endotelálních, hematopoetických, nervových a u určitého typu mesenchymálních buněk. Identifikace a charakterizace signální dráhy TGF β pomůže porozumět úloze TGF β na jedné straně jako tumorsupresorového genu obvykle v počátečním stadiu maligního růstu a na druhé straně naopak jako onkogenního faktoru v pozdních fázích malignit zejména u metastáz. V pozdní fázi vzniku epitelálního nádoru se buňky často stávají rezistentními na inhibiční účinek TGF β kvůli inaktivaci signální dráhy TGF β nebo v důsledku abnormální regulace buněčného cyklu. Cytokiny rodiny TGF β regulují tedy růst a diferenciaci různých buněk. Poněvadž TGF β je potenciální růstový inhibitor většiny typu buněk, regulace signalizace TGF β může být spojována s postupem nádoru (zabránění přenosu signálu od TGF β vede k nádorům). Sledovali jsme působení potenciálních chemoterapeutik (inhibitorů MAP-kináz, histodeacetyláz a proteazomů) na

složky signální dráhy TGF β . Změřili jsme se především na jeden z inhibitorů proteazomů bortezomib, který je již klinicky používán u pacientů s mnohočetným myelomem rezistentních na zavedené terapie.

Akutní myeloidní leukémie (AML) a myelodysplastický syndrom (MDS) jsou onemocnění s velkou biologickou a klinickou heterogenitou [1]. Přestavby chromozomů byly nalezeny u přibližně 55% dospělých pacientů s AML a asi u 30-50% pacientů s MDS. Tedy 40% až 45% AML tvoří AML s normálním karyotypem, které nevykazují žádné charakteristické morfologické změny. Mutace transkripčního faktoru "CCAAT/enhancer-binding protein" (C/EBP) alfa (CEBPA), které mají za výsledek buď dominantně negativní formy tohoto transkripčního faktoru nebo jeho nedostatek pro funkci v diferenciaci na monocyty a granulocyty, jsou spojeny s lepší než průměrnou prognózou [2]. Vedle mutací genu *CEBPA*, které jsou příznivým prognostickým faktorem, patří mezi negativní prognostické faktory důležité pro léčebnou strategii zvýšená hladina mRNA pro transkripční faktor EVI1 ("Ecotropic Virus Integration Site 1") [3], zvýšená hladina mRNA pro ERG ("ETS-related gene") [4,5] a mRNA pro MN1 ("Meningioma 1") [6,7-9].

Sekvenování velkého počtu vzorků, které jsme předpokládali u detekce mutací *CEBPA* u pacientů s AML, je velmi zdlouhavé, proto jsme plánovali v rámci této práce testování a zavedení nové metody mutačního skríninku – HRMA (high-resolution melting analysis). Samotné analýze genu *CEBPA* předcházelo testování metody na genu *MYH9*. Lidský gen *MYH9* („myosin heavy chain 9“) je lokalizován na chromosomu 22q11.2 [10], sestává ze 40 exonů a kóduje těžký řetězec nesvalového myosinu IIA. Mutace v tomto genu způsobují onemocnění souhrně nazývaná „MYH9 onemocnění“, která charakterizují velké destičky, trombocytopenie a kombinace granulocytárních inkluzí, hluchoty, zákalů a selhání ledvin.

2. Hypotézy a cíle práce

Cílem práce je nalézt účinné látky, které ovlivní signální TGF β takovým způsobem, aby byla inhibována leukemogeneze. Dále řispet k objasnění role TGF β v buňkách izolovaných z kostní dřeně nebo periferního oběhového systému pacientů s AML (akutní myeloidní leukémie) a MDS (myelodysplastický syndrom), analyzovat TGF β jako potenciální nádorový supresor na základě analýzy výskytu mutací signální dráhy TGF β v leukemických a MDS buňkách.

Vedle cytogenetiky, která je důležitým prognostickým faktorem, mutace specifických genů a změněná exprese určitých genů také dovoluje stanovit prognózu u akutní myeloidní leukémie

(AML) a myelodysplastického syndromu (MDS). Zejména pro AML s normálním karyotypem (40-45% případů AML) je významná analýza důležitých prognostických faktorů: mutace transkripčního faktoru CCAAT/enhancer-binding protein alfa (CEBPA), spojené s lepší než průměrnou prognózou a zvýšená exprese genů *ERG* (“ETS-related gene”), *MN1* (“Meningioma 1”) a *EVII* (“Ecotropic Virus Integration Site 1”), které jsou naopak spojené se špatnou předpovědí pro léčbu pacientů s AML a v případě zvýšené hladiny *EVII* mRNA i se špatnou předpovědí pro léčbu u pacientů s MDS. Pro detekci mutací v genu *CEBPA* jsme chtěli zavést novou metodu, která je založena na rozdílnosti křivek tání PCR produktů s mutací a bez mutace – metoda high-resolution melting analysis (HRMA).

Naší analýzou mutací *CEBPA* a studiím exprese genů *ERG*, *MN1* a *EVII* na úrovni hladiny odpovídajících mRNA pomocí kvantitativní PCR chceme přispět k přesnějšímu stanovení prognózy pacientů s AML a MDS a následně i k efektivnější terapii.

3. Materiál a metodika

Počáteční pokusy byly provedeny na liniích leukemických buněk. Expresi genů pro receptory TGFβ, proteiny Smad a cílové proteiny signální dráhy TGFβ byly analyzovány semikvantitativní RT-PCR a kvantitativní qPCR, u vybraných genů na úrovni proteinu western blotem. Sledovali jsme vliv činidel, která by mohla v budoucnu najít použití v terapii, na signální dráhu TGFβ. Použili jsme specifické inhibitory MAP-kináz (PD98059, UO126, SB203580 aj.), inhibitory histondeacetyláz (HDAI) a proteazomů. Sekvenovali jsme exony genů signalizačních komponent dráhy TGFβ u buněčných linií a pacientů s AML a MDS.

Vzorky s mutací *CEBPA* měly být detekovány metodou HRMA a následně osekvenovány. HRMA je účinná metoda pro detekci mutací umožňující rychle rozlišit negativní vzorky od pozitivních (mutovaných) pomocí PCR reakce a specifického fluorescenčního barviva LC Green plus. Schopnost této metody spolehlivě zachytit každý mutovaný vzorek byla nejdříve ověřena na analýze exonů genu *MYH9* u sedmi pacientů s makrotrombocytopenií. Odlišný gen byl zvolen proto, že laboratoř, kde testování HRMA probíhalo, se zaměřila na trombocytopenie.

Stanovili jsme sekvenací DNA a cDNA mutace transkripčního faktoru CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alfa (*CEBPA*) spojené s lepší než průměrnou prognózou pro pacienty s AML s normálním karyotypem a pomocí kvantitativní PCR expresi genů *ERG*, *MN1* a *EVII*, jejichž zvýšená exprese je naopak spojena se špatnou předpovědí pro léčbu

pacientů s AML s normálním karyotypem a v případě zvýšené hladiny EVI1 mRNA i se špatnou předpovědí pro léčbu u pacientů s MDS.

4. Výsledky

Všechny složky signální dráhy TGFβ1 jsou exprimovány v buňkách ML2 a jsou snadno detekovatelné na úrovni mRNA. Nezjistili jsme inhibiční účinek TGFβ1 na proliferaci ML2 buněk za použití inkorporace [6-³H] thymidinu do buněk. Sekvenovali jsme exony genů signálních komponent TGFβ v ML2 buňkách, ale žádnou mutaci jsme nezachytili. Naše výsledky naznačují, že rezistence ML2 buněk k TGFβ1 je způsobena jinými faktory než mutací/emi genů signální dráhy TGFβ1. Bortezomib indukoval apoptózu u buněčných leukemických linií Kasumi1, CTV1, ML2, ale ne u buněk ML1. Buňky linie Kasumi1 a ML2 byly také citlivé k indukci apoptózy vyvolané působením TGFβ1, ale v menší míře než u bortezomibu. Buňky linie ML1 byly rezistentní proti oběma induktorům apoptózy.

Neprokázali jsme žádnou mutaci v kódujících oblastech genů signální dráhy TGFβ1 u pacientů s MDS a AML, ale zjistili jsme sníženou nebo nedetekovatelnou expresi analyzovaných genů. Zároveň jsme nenalezli žádnou mutaci uvedených genů u použitých buněčných linií.

Analýzovali jsme expresi hladin mRNA pro geny EVI1, ERG a MN1 u pacientů s diagnózou MDS nebo AML metodou kvantitativní PCR v čase. Pacienti s MDS byly vyšetřeny pouze na expresi EVI1, jehož zvýšená hladina mRNA je spojována se špatnou prognózou. Ze 485 vzorků s prokázaným MDS mělo 90 zvýšenou expresi EVI1 a ze 71 vzorků se suspektním MDS byla zjištěna zvýšená exprese EVI1 u 11 případů. Pacienti s AML měli také zvýšenou expresi EVI1 a to u 62 vzorků ze 436, dvojnásobné množství mělo zvýšenou expresi ERG a u více jak dvojnásobného počtu byla zjištěna overexprese MN1. Výskyt zvýšené exprese rizikových faktorů EVI1, ERG a MN1 byl podobný u pacientů s normálním i změněným karyotypem, s výjimkou EVI1 u MDS.

Při analýze vzorků na přítomnost mutace *MYH9* se HRMA osvědčila jako účinná a spolehlivá metoda (41 vzorků z 280 PCR produktů bylo označeno jako odlišných od kontrol, u 5 byla nalezena mutace). Proto jsme tuto metodu použili také pro preskrínink pacientů na přítomnost mutací v genu CEBPA. V tomto případě falešná pozitivita dosáhla až 60% a rozdíl tvaru křivek tání mutovaných a nemutovaných vzorků nebyl natolik výrazný, aby bylo možné určit, které PCR produkty obsahují mutaci či polymorfismus.

Celkem jsme analyzovali 295 patientských vzorků na přítomnost mutace v genu CEBPA – 143 pacientů s MDS a 152 pacientů s AML. Z uvedeného počtu pacientů mělo pět s diagnózou MDS mutaci v genu CEBPA, polymorfismus byl detekován v genu CEBPA v 51 případech. U pacientů s AML jsme detekovali ve 14 případech mutaci v CEBPA a u 42 pacientů s AML byl zjištěn polymorfismus. Zjištěné mutace CEBPA nebyly zjištěny u žádného ze 41 zdravých kontrolních vzorků.

5. Diskuse

Vliv TGFβ1 na ML2 buněčnou linii nebyl dosud zkoumán. Ukázali jsme, že buňky myelomonocytární line ML2 jsou odolné proti TGFβ1. Rezistence proliferace buněk ML2 buněk na TGFβ1 není způsobena anti-apoptotickým účinkem TGF-β1, který byl nalezen v lidských monocytárních leukemických buňkách U937 [11]. Všechny složky signalizační dráhy TGFβ1 (receptory a Smad proteiny) a všechny cílové geny této dráhy byly detekovány na úrovni mRNA v buňkách ML2. TGFβ1 nemá žádný signifikantní účinek na expresi těchto genů (*RhoA*, *cdc25A*, *VEGF*) v buněčné linii ML2. Skutečnost, že hladina mRNA *RhoA* nereaguje na TGFβ1 v buňkách ML2, může také přispět k resistenci proliferace buněk ML2 na TGFβ1. SnoN je jaderný korepresor pro Smad4, který interaguje s ostatními transkripčními korepresory a HDAC [12,13]. Vzhledem k tomu, že jsme zjistili zvýšenou hladinu SnoN na úrovni proteinu po přidání TGFβ1, je možné, že se SnoN podílí na resistenci buněk ML2 na TGFβ1. Metodou western blot jsme nezachytili proteiny p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1} v buňkách ML2 bez TGFβ1 a po působení TGFβ1 24h. Tento fakt může také přispět k resistenci buněk ML2 na TGFβ1 indukovanou inhibicí růstu.

TGFβ1 inhibovalo syntézu DNA pouze v buňkách Kasumi1 ale u ostatních buněčných linií už ne. Bortezomib, jako potenciální inhibitor syntézy DNA u všech čtyř typů leukemických buněčných linií, indukoval apoptózu v největší míře u buněk CTV1, dále pak u Kasumi1 a ML2, ale ne u buněk ML1. Použití kombinace bortezomibu a TGFβ1 zvýšilo apoptotický účinek proti samotnému bortezomibu u buněk linie ML2 na rozdíl od buněk ML1 a CTV1. Buňky linie ML1 byly rezistentní proti oběma induktorům apoptózy (TGFβ, bortezomib). Naše výsledky ukazují antiproliferační a proapoptotický účinek bortezomibu v lidských AML buněčných liniích. Rozdílná citlivost lidských buněčných linií k TGFβ1 a bortezomibu odráží chování primárních leukemických buněk u pacientů, u nichž je velkým problémem různorodost onemocnění daná množstvím genetických změn a profily imunofenotypu. Použití inhibitorů proteazomů v terapii bude tímto limitováno.

Neprokázáli jsme žádnou mutaci v kódujících oblastech genů složek signální dráhy TGFβ1 u pacientů s MDS a AML, ale zjistili jsme sníženou nebo nedetekovatelnou expresi analyzovaných genů. Snížená exprese je zřejmě způsobena epigenetickými změnami, tedy hypermetylací a deacetylací promotorových oblastí těchto genů. Zároveň jsme nenalezli žádnou mutaci uvedených genů u použitých buněčných linií.

Analyzovali jsme stovky vzorků pacientů s MDS a AML na expresi mRNA genů EVI1, ERG a MN1 a kromě MN1 jsme potvrdili jejich klinický význam jako negativních prognostických faktorů u těchto hematologických malignit.

Vzorky pacientů s MDS a především AML jsme analyzovali také na přítomnost mutace v genu CEBPA. Z důvodu analýzy velkého množství vzorků měla být pro preskrínink mutací CEBPA využita nová metoda - high-resolution melting analysis, HRMA. Účinnost a spolehlivost metody byla nejdříve ověřena skríníngem sedmi pacientů s makrotrombocytopenií na přítomnost mutace v genu MYH9. Bohužel HRMA není vhodná pro detekci mutací v genu CEBPA – falešná pozitivita dosáhla až 60% a rozdíl tvaru křivek tání mutovaných a nemutovaných vzorků nebyl natolik výrazný, aby bylo možné spolehlivě označit PCR produkty obsahující mutaci či polymorfismus. Selhání HRMA mohlo být způsobeno přítomností více PCR produktů v jednom vzorku (více než jeden proužek na gelu); u genu MYH9 byl přítomen vždy pouze jeden PCR produkt.

Oproti zvýšené expresi EVI1 a ERG, mutace v genu pro CEBPA jsou považovány za prognosticky příznivý faktor [14,15]. Našli jsme 22 nových, dosud nepopsaných mutací v genu CEBPA. Změny struktury C/EBPα v důsledku uvedených delecí většinou znamenají ztrátu funkce oblasti BR a leucinového zipu a tím i funkce transkripčního faktoru C/EBPα a jeho antiproliferační aktivity.

6. Závěry

Vliv TGFβ1 na hladinu mRNA příslušných cílových genů většinou odpovídá běžnému působení tohoto cytokinu u řady typů buněk. Účinek TGFβ1 na proliferaci buněk ML2 neodpovídá inhibičnímu účinku na proliferaci buněk. Buňky ML2 jsou resistantní na anti-proliferační vliv TGFβ1. Z dosažených výsledků se domníváme, že tato skutečnost je způsobena stimulací hladiny mRNA onkoproteinů.

Tato práce přináší první důkaz, že abnormálně zvýšená hladina SnoN a nedetekovatelná hladina důležitých regulátorů buněčného cyklu p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1} v buňkách ML2 může

vést k resistenci proliferace buněk na inhibiční účinek TGFβ1. Látky, které jsou schopny obnovit normální hladinu těchto proteinů, mohou zastavit resistenci proliferace buněk na inhibiční účinek TGFβ1 a mohly by být v budoucnu využity jako chemoterapeutika.

Otázku, zda je třeba u pacienta s AML a normálním karyotypem při detekované nepřítomnosti negativních prognostických faktorů (zvýšené exprese genů *ERG*, *EVII*) podstoupit transplantaci kostní dřeně, je nutno řešit komplexně. Samozřejmě je nutné posoudit i další negativní prognostické faktory jako jsou mutace *MLL*, *FLT3-ITD*, exprese *BAALC* a samozřejmě i stáří pacienta. Při nepřítomnosti nepříznivých prognostických faktorů, zejména mutací tyrosinové kinázy FLT3, se zvláště v případech přítomnosti mutace v *NPM1* dnes ve světě k transplantaci nepřistupuje.

Zhodnocením všech uvedených prognostických faktorů, ať už negativních jako jsou *ERG*, *EVII*, *FLT3*, či pozitivních jako mutace v *CEBPA*, lze získat komplexní obraz, který by měl přispět k efektivnější léčbě nemocných s AML a MDS.

7. Použitá literatura

1. Haferlach T, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 2007,14:90-97
2. Fuchs O. Growth-inhibiting activity of transcription factor C/EBPalpha, its role in haematopoiesis and its tumour suppressor or oncogenic properties in leukaemias. *Folia Biol (Praha)*. 2007,53:97-108
3. Haas K, Kundi M, Sperr WR, Esterbauer H, Ludwig WD, Ratei R, Koller E, Gruener H, Sauerland C, Fonatsch C, Valent P, Wieser R. Expression and prognostic significance of different mRNA 5'-end variants of the oncogene EVI1 in 266 patients with de novo AML: EVI1 and MDS1/EVI1 overexpression both predict short remission duration. *Genes Chromosomes Cancer* 2008,47:288-298
4. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrózek K, Whitman SP, Kolitz JE, Edwards CG, Vardiman JW, Powell BL, Baer MR, Moore JO, Perrotti D, Caligiuri MA, Carroll AJ, Larson RA, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2005,23:9234-9242
5. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, Mrózek K, Baldus CD, Carroll AJ, Powell BL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD; Cancer and Leukemia Group B Study. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 2007,25:3337-3343
6. Mrózek K, Döhner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2007,14:106-114

7. Heuser M, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Yung E, Piper J, Fung S, Schlenk RF, Dohner K, Hinrichsen T, Rudolph C, Schambach A, Baum C, Schlegelberger B, Dohner H, Ganser A, Humphries RK. MN1 overexpression induces acute myeloid leukemia in mice and predicts ATRA resistance in patients with AML. *Blood* 2007,110:1639-1647
8. Carella C, Bonten J, Sirma S, Kranenburg TA, Terranova S, Klein-Geltink R, Shurtleff S, Downing JR, Zwarthoff EC, Liu PP, Grosveld GC. MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML. *Leukemia* 2007,21:1679-1690
9. Grosveld GC. MN1, a novel player in human AML. *Blood Cells Mol Dis.* 2007,39:336-339
10. Leal A, Ende S, Stengel C, Huehne K, Loetterle J, Barrantes R, Winterpacht A and Rautenstrauss B. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. *Gene* 2003,312:165-171
11. Lee J, Park B-J, Park J-H, Yang M-H, Chi C-G. TGF- β 1 inhibition of apoptósis through the transcriptional up-regulation of Bcl-XL in human monocytic leukemia U937 cells. *Exp Mol Med* 1999,31:126-33
12. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001,12:1-8
13. Luo K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2004,14:65-70
14. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, et al. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009,113:3088–3091
15. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer* 2009,100:1343–1346

Seznam publikací

1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace
 - a) s impact factorem (IF)
 1. *CEBPA* polymorphisms and mutations in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. Fuchs O., Provaznikova D., Kocova M., Kostecka A., Neuwirtova R., Kobylka P., Cermak J., Brezinova J., Schwarz J., Salaj P., Klamova H., Maaloufova J., Lemez P., Novakova L., Benesova K. *Blood Cells Mol.Diseases* 2008,40:401-405, IF-2,555
 2. High-Resolution Melting Analysis for Detection of MYH9 Mutations. Provaznikova D., Kumstyrova T., Kotlin R., Salaj P., Matoska V., Hrachovinova I., Rittich S. *Platelets* 2008,19(6):471-475, IF-1,915
 3. Nature of frequent deletions in CEBPA. Fuchs O, Kostecka A, Provaznikova D, Krasna B, Brezinova J, Filkukova J, Kotlin R, Kouba M, Kobylka P, Neuwirtova

R, Jonasova A, Caniga M, Schwarz J, Markova J, Maaloufova J, Sponerova D, Novakova L, Cermak J. Blood Cells Mol.Diseases 2009, 43:260-263, IF-2,749

4. Unusual 80 months long survival of a 67-year-old patient with near-tetraploid acute myeloid leukemia M0, ERG overexpression and without erythroblastic and megakaryocytic dysplasia. Lemež P., Klamová H., Zemanová Z., Marinov I., Fuchs O., Schwarz J., Březinová J., Provazníková D., Kostečka A., Marková J., Michalová K., Jelínek J. přijato do Acta Haematologica 2011, IF-1,069

b) bez IF

1. Protein promyelocytární leukémie a porucha signální dráhy transformačního růstového faktoru-beta u akutní promyelocytární leukémie. Fuchs O., Provazníková D., Pešlová G. Časopis lékařů českých 2005, 144(2):90-94
2. The Increased Expression of SnoN and Undetectable Levels of Important Cell Cycle Regulators, Proteins p21Waf1/Cip1 and p27Kip1 as Probable Causes of the Resistance of ML-2 Cells Proliferation to Transforming Growth Factor-β1. Provazníková D., Pešlová G., Marinov I., Babusiak M., Vyoral D., Fuchs O. New Research on Signal Transduction, Nova publishers, 2007, Chapter 9, 189-209
3. Antiproliferative and proapoptotic effects of proteasome inhibitors and their combination with histone deacetylase inhibitors on leukemia cells. Fuchs O., Provaznikova D, Marinov I, Kuzelova K, Spicka I. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2009,9:62-77

2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

a) s IF

1. Clinical manifestation and molecular genetic characterization of MYH9 disorders. Provaznikova D., Geierova V., Kumstyrova T., Kotlin R., Mikulenkova D., Zurkova K., Matoska V., Hrachovinova I., Rittich S. Platelets 2009,20(5):289-296, IF-2,271
2. A partial nontandem duplication of the MLL gene in four patients with acute myeloid leukemia. Sárová I, Březinová J, Zemanová Z, Lizcová L, Berková A, Izáková S, Malinová E, Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, Filkuková J, Maaloufova J, Starý J, Michalová K. Cancer Genet Cytogenet 2009,195:150-156, IF-1,537
3. CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA) polymorphisms and mutations in healthy individuals and in patients with peripheral artery disease, ischaemic heart disease and hyperlipidaemia. Fuchs O, Kostečka A, Provazníková D, Krásná B, Kotlin R, Stanková M, Kobylka P, Dostálová G, Zeman M, Chochola M. Folia Biol 2010,56:51-57, IF-0,924
4. Manifestation of atypical hemolytic uremic syndrome caused by novel mutations in MCP. Provaznikova D, Rittich S., Malina M., Seeman T., Marinov I., Riedl M. and Hrachovinova I. přijato do Ped Neph 2011, IF-2,425, DOI: 10.1007/s00467-011-1943-5

8. Příloha

Doložení o člancích přijatých k publikaci:

„Unusual 80 months long survival of a 67-year-old patient with near-tetraploid acute myeloid leukemia M0, ERG overexpression and without erythroblastic and megakaryocytic dysplasia”

```
# ----- Původní zpráva -----  
# Od: <aha@karger.ch>  
# Komu: <plemez@post.cz>,  
# Kopie:  
# Předmět: Ms. No. 201011010, Acta Haematologica  
# Datum: 07.4.2011 17:35:55  
# -----  
#  
# Ms. No.: 201011010  
# Title: Unusually long survival of 67-year-old patient with near-tetraploid acute  
# myeloid leukemia M0 without erythroblastic and megakaryocytic dysplasia  
#  
# Dear Dr. med. Lemez,  
#  
# Thank you for submitting your manuscript to Acta Haematologica. On behalf of  
# Editor-in-Chief, Prof. I. Ben-Bassat, I am pleased to inform you that it has now  
# been accepted for publication and passed on to our production department from  
# whom you will hear shortly.  
#  
# We hope you will continue to submit work from your group to Acta Haematologica  
# in the future.  
#  
# Sincerely yours,  
# Susan Aeschbach  
# "Acta Haematologica"  
# Editorial Office  
# S. Karger AG - Medical and Scientific Publishers  
# e: aha@karger.ch  
# f: +41 61 306 1434  
# t: +41 61 306 1344  
# w: www.karger.com/aha  
#  
#  
#  
#  
#
```

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí
do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis